

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR UNGU  
(*Ipomoea batatas L.Lam*) TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$   
DAN HISTOPATOLOGI ILEUM TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) MODEL *INFLAMMATORY  
BOWEL DISEASE* YANG DIINDUKSI  
INDOMETASIN**

**SKRIPSI**

Oleh:

**DESY SETYONINGSIH**

**145130100111023**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR UNGU  
(*Ipomoea batatas L.Lam*) TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$   
DAN HISTOPATOLOGI ILEUM TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) MODEL *INFLAMMATORY  
BOWEL DISEASE* YANG DIINDUKSI  
INDOMETASIN**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**DESY SETYONINGSIH**

**145130100111023**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR UNGU  
(*Ipomoea batatas L.Lam*) TERHADAP EKSPRESI TNF- $\alpha$   
DAN HISTOPATOLOGI ILEUM TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) MODEL *INFLAMMATORY  
BOWEL DISEASE* YANG DIINDUKSI  
INDOMETASIN**

Oleh:

**DESY SETYONINGSIH**

**145130100111023**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada tanggal 19 – 07 – 2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

**Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D.**

NIP. 19810504 200501 1 001

**drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet.**

NIP. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.**

NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Desy Setyoningsih

NIM : 145130100111023

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Histopatologi Ileum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 7 Agustus 2018

Yang menyatakan,

Desy Setyoningsih

NIM. 145130100111023

**Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*)  
Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Histopatologi Ileum Tikus  
(*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel*  
*Disease* yang Diinduksi Indometasin**

**ABSTRAK**

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) merupakan penyakit peradangan pada saluran pencernaan seperti duodenum, jejunum, ileum dan kolon yang menyerang hewan dan manusia. Salah satu faktor penyebab penyakit ini adalah induksi obat-obatan NSAID seperti indometasin. Daun ubi jalar ungu mengandung senyawa flavonoid, polifenol dan antosianin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  dan histopatologi ileum tikus model IBD. Model IBD diperoleh dari induksi indometasin 15 mg/kg/BB secara per oral. Penelitian menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 8-12 minggu, dibagi menjadi 5 kelompok penelitian yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dosis terapi 600, 700 dan 800 mg/kg/BB. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu diberikan selama 7 hari secara peroral. Pengamatan Ekspresi TNF- $\alpha$  menggunakan teknik imunohistokimia dan perubahan histopatologi ileum dengan pewarnaan HE. Perubahan histopatologi ileum berupa data kualitatif yang dianalisa secara deskriptif. Selain itu, ekspresi TNF- $\alpha$  dianalisa secara kuantitatif dengan menggunakan program *Immuno Ratio* dan dilanjutkan dengan metode *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Tukey dengan  $\alpha = 0,05$ . Hasil menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu pada tikus model IBD mampu menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  paling baik sebesar 74,73% dan perbaikan sel epitel, sel goblet serta penurunan infiltrasi sel radang.

**Kata kunci** : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indometasin, Daun ubi jalar ungu, Ekspresi TNF- $\alpha$ , dan histopatologi ileum.

**The Effect of Purple Sweet Potato Leaves (*Ipomoea batatas* L.Lam) Extract  
on TNF- $\alpha$  Expression and Histopathological on Rats  
(*Rattus norvegicus*) Ileum of *Inflammatory  
Bowel Disease* Model Induced  
by Indomethacin**

**ABSTRACT**

Inflammatory Bowel Disease is digestive disorder caused inflammation in duodenum, jejunum, ileum and colon that attacks animal and humans. *Inflammatory Bowel Disease* also caused by NSAID drugs such as indomethacin. Purple sweet potato leaves contain flavonoid, polyphenols and anthocyanin compounds. This study aims to determine the effect of purple sweet potato leaves extract on TNF- $\alpha$  expression and histopathology ileum on rats IBD model. Rats of IBD model were obtained from indomethacin induction as much as 15 mg / kg / BW orally. The research used male rats (*Rattus norvegicus*) aged 8-12 weeks and divided into 5 groups, they are negative control group, positive control group, therapy group with doses 600, 700 and 800 mg / kg / BW. Ethanol extract of purple sweet potatoes leaves given for 7 days orally. TNF- $\alpha$  expression determined by immunohistochemistry and ileum histopathology stained by HE stain. Histopathology of ileum was analyzed descriptively. In addition, TNF- $\alpha$  expression was analyzed quantitatively with Immuno Ratio programing continued by One Way Analysis of Variance (ANOVA) and continued with Tukey test with  $\alpha = 0.05$ . The results showed that ethanol extract of purple sweet potato leaves was able to decrease TNF- $\alpha$  expression at best 74.73% and repair of epithelial cell, goblet cell and decreased infiltration of inflammatory cells.

**Keyword** : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), Indomethacin, Purple sweet potato leaves, TNF- $\alpha$  expression and ileum histopathology.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  dan Histopatologi Ileum Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin”

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu, memberikan arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan tugas akhir. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Edwin Widodo, S.Si., M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing I, yang telah memberikan bimbingan, nasehat, dan arahan serta meluangkan waktunya dalam penyusunan dan penyempurnaan tugas akhir ini.
2. drh. Viski Hendrawan, M.Vet. selaku Dosen Pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, nasehat, dan arahan serta meluangkan waktunya dalam penyusunan dan penyempurnaan tugas akhir ini.
3. drh. Herlina Pratiwi, M.Si. selaku Dosen Pembimbing II, yang telah memberikan bimbingan, nasehat, dan arahan serta meluangkan waktunya dalam penyusunan dan penyempurnaan tugas akhir ini.
4. drh. Fidi Nur Aini. EPD, M.Si selaku Dosen Penguji I, yang akan memberikan kritik dan saran serta arahan dalam penyusunan dan penyempurnaan tugas akhir ini.
5. drh. Albiruni Haryo, M.Sc selaku Dosen Penguji II, yang akan memberikan kritik dan saran serta arahan dalam penyusunan dan penyempurnaan tugas akhir ini.
6. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Seluruh staf, teknisi, dan laboran Laboratorium Farmakologi Kedokteran UB atas segala bantuan, dukungan dan kerjasama dalam menyelesaikan penelitian ini.

8. Kedua orang tua penulis, abah Riyanto dan ibunda Suningsih, yang telah memberikan doa, kasih sayang, dukungan, dan pengorbanan baik secara moril dan materil kepada penulis, semoga Allah SWT. membalas dengan sebaik-baiknya.
9. Kakak penulis, Ika Maya Riyanti Ningsih dan adik penulis A. Triyanto Nugroho yang telah memberikan doa dan semangat pada penulis dalam penyusunan skripsi ini.
10. Rekan seperjuangan pelaksanaan skripsi Hanun, Restifa, Laras dan Davinci yang banyak membantu, memotivasi, dan memberikan dukungan selama penyusunan skripsi ini.
11. Teman-teman Amaze 2014-A atas kekompakan, kebersamaan yang tak akan terlupakan, dan dukungan selama empat tahun ini, serta teman-teman mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan.
12. Teman-teman seperjuangan Kolega FKH UB angkatan 2014 yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
13. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin disebutkan satu persatu.

Penulis berharap skripsi ini dapat diterima sehingga dapat memberikan pengalaman serta wawasan baru terhadap penulis. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut.

Malang, 7 Agustus 2018

Penulis



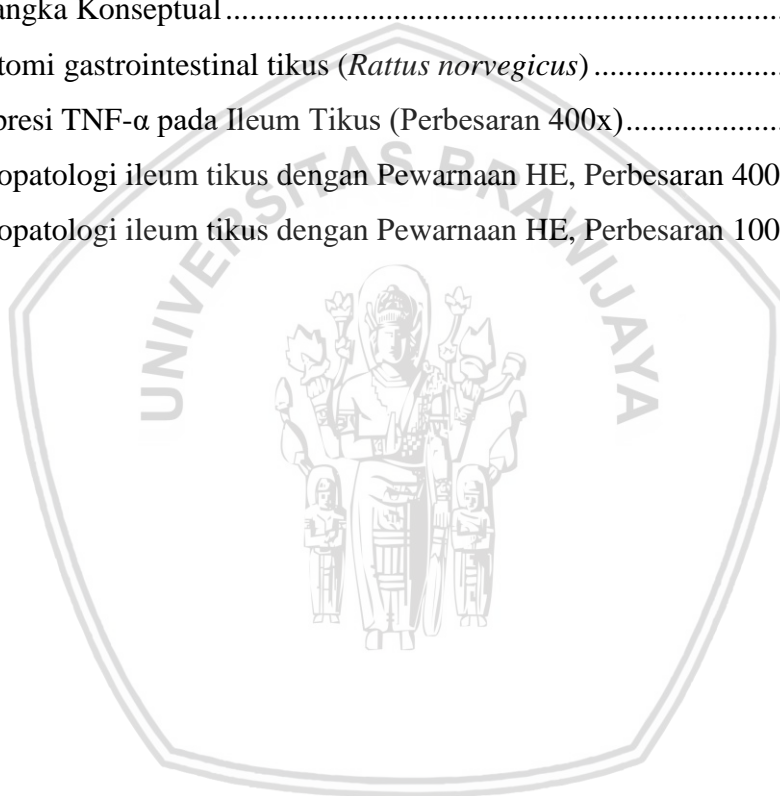
## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....</b>	<b>xiii</b>
 <b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	 <b>1</b>
1.1.Latar Belakang .....	1
1.2.Rumusan Masalah .....	5
1.3.Batasan Masalah.....	5
1.4.Tujuan Penelitian.....	6
1.5.Manfaat Penelitian.....	6
 <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	 <b>7</b>
2.1. <i>Inflammatory Bowel Disease (IBD)</i> .....	7
2.1.1. Etiologi .....	7
2.1.2. Patomekanisme.....	8
2.1.3. Ekspresi TNF- $\alpha$ pada <i>Inflammatory Bowel Disease</i> .....	10
2.1.4. Histopatologi Ileum pada <i>Inflammatory Bowel Disease</i> .....	11
2.2. Hewan Coba Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	12
2.3. Efek Indometasin pada Ileum Tikus.....	14
2.4. Daun Ubi Jalar Ungu ( <i>Ipomoea batatas L.Lam</i> ) .....	16
2.4.1. Taksonomi .....	16
2.4.2. Kandungan Daun Ubi Jalar Ungu .....	17
 <b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	<b>20</b>
3.1.Kerangka Konseptual .....	20
3.2.Hipotesis Penelitian.....	23
 <b>BAB 4. METODE PENELITIAN.....</b>	 <b>24</b>
4.1.Tempat dan Waktu Penelitian .....	24
4.2.Alat dan Bahan Penelitian .....	24
4.3.Rancangan Penelitian .....	25

4.4.Sampel Penelitian .....	26
4.5.Variabel Penelitian .....	27
4.6.Tahapan Penelitian .....	27
4.6.1.Preparasi Hewan Coba.....	27
4.6.2.Tatalaksana Pembuatan Hewan Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> dengan Induksi Indometasin.....	28
4.6.3.Pembuatan Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu ( <i>Ipomoea batatas L.Lam</i> ) .....	29
4.6.4.Pemberian Terapi Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu ( <i>Ipomoea Batatas L.Lam</i> ) pada Hewan Model IBD.....	29
4.6.5.Preparasi Ileum Tikus untuk Pembuatan Preparat Histopatologi Dan Preparat Immunohistokimia .....	30
4.6.6.Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksili Eosin (HE) .....	32
4.6.7.Penentuan Ekspresi TNF- $\alpha$ dengan Immuno-histokimia.....	35
4.7. Analisa Data .....	37
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	38
5.1.Tikus Model IBD (Inflammatory Bowel Disease).....	38
5.2.Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$ Ileum Tikus Putih Model IBD.....	39
5.3.Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum Tikus Putih Model IBD.....	45
<b>BAB 6. PENUTUP</b> .....	53
6.1.Kesimpulan.....	53
6.2.Saran .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	54
<b>LAMPIRAN</b> .....	61

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Patogenesis <i>Inflammatory Bowel Disease</i> . ....	9
2.2. Gambaran histologi ileum normal.....	12
2.3. Hewan coba tikus putih.....	13
2.4. Daun ubi jalar ungu.....	16
3.1. Kerangka Konseptual.....	20
4.1. Anatomi gastrointestinal tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	31
5.1. Ekspresi TNF- $\alpha$ pada Ileum Tikus (Perbesaran 400x).....	40
5.2. Histopatologi ileum tikus dengan Pewarnaan HE, Perbesaran 400x .....	46
5.3. Histopatologi ileum tikus dengan Pewarnaan HE, Perbesaran 1000x .....	47



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1. Rancangan Kelompok Penelitian .....	26
5.1. Rata-Rata Ekspresi TNF- $\alpha$ Ileum Tikus Putih .....	41



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Layak Etik .....	61
2. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian .....	62
3. Perhitungan Dosis Indometasin .....	64
4. Pembuatan Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu.....	65
5. Perhitungan Dosis Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu .....	66
6. Pembuatan Preparat Histopatologi Ileum dengan Pewarnaan HE .....	67
7. Pengukuran Ekspresi TNF- $\alpha$ Ileum Pewarnaan Imunohistokimia.....	68
8. Data Perubahan Berat Badan Tikus .....	70
9. Data dan Uji Statistik Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	71
10. Foto Kegiatan.....	78

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APCs	<i>Antigen-presenting cell</i>
ATP	<i>Adenosin Triphosphat</i>
BALITKABI	Balai Penelitian Tanaman Umbi dan Kacang
BB	Berat Badan
CD	<i>Crohn Disease</i>
COX-1	<i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
GAE	<i>Gallic Acid Equivalence</i>
HE	<i>Hematoksin-Eosin</i>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IBF	<i>Intestinal Barrier Function</i>
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IHK	Immunohistokimia
I $\kappa$ B	<i>Inhibition Kappa B</i>
IL-12	<i>Interleukin-12</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililiter
LOX	<i>Lipooxygenase</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NSAID	<i>Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>



PFA	<i>Paraformaldehyde</i>
PGE2	Prostaglandin-2
PO	Peroral
RAL	Rancangan Acak Lengkap
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SH-ARP	<i>Strep-Avidin-Horseradish Peroxidase</i>
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
Th-1	T helper 1
Th-2	T helper 1
TLR4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor Alfa</i>
UC	<i>Ulcerative Colitis</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
QE	<i>Quercetin Equivalence</i>



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1.Latar Belakang

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) terdiri atas 2 jenis yaitu *Ulcerative Colitis* (UC) dan *Crohn Disease* (CD) merupakan penyakit yang menyebabkan inflamasi kronis pada saluran pencernaan terutama kolon dan usus halus (Aulanni'am, *et al.*, 2012). *Crohn Disease* (CD) merupakan salah satu jenis IBD yang menyebabkan terjadinya inflamasi pada saluran pencernaan dan umumnya ditemukan pada bagian duodenum, jejunum, ileum terminalis, dan sekum. Sedangkan pada *Ulcerative Colitis* (UC) terjadi lesi pada area kolon, biasanya sering dijumpai pada area rektum dan proksimal rektum (Bures, *et al.*, 2011). *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dapat terjadi baik pada manusia dan hewan. Kasus IBD pada manusia mengalami peningkatan setiap tahunnya dengan tingkat kejadian yang tinggi pada negara-negara barat. Insiden terjadinya IBD secara global ialah sebanyak 10 kasus per 100.000 penduduk, 2,2 – 14,3 kasus per 100.000 penduduk pertahunnya untuk terjadinya *Ulcerative Colitis* (UC) dan 3,1 – 14,6 kasus per 100.000 penduduk pertahunnya untuk terjadinya *Crohn Disease* (Firmansyah, 2013). *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) merupakan penyakit yang rentan terjadi pada anjing. Berdasarkan catatan medis oleh The Queen Mother Hospital, kasus IBD pada anjing tercatat sebanyak 546 kasus pada spesies anjing yang berbeda mulai dari tahun 2003 hingga 2009 (Kathrani, *et al.*, 2011). Namun di Indonesia sendiri kasus IBD masih belum dilaporkan dan belum adanya penelitian mengenai kejadian yang terjadi di lapangan.

Etiologi dari penyakit IBD sampai saat ini belum diketahui secara pasti, namun berdasarkan beberapa penelitian yang dilakukan, diketahui bahwa IBD dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti lingkungan, gen, penurunan sistem imun dan ketidakseimbangan mikroba dalam intestinal (Kazuhide, *et al.*, 2009). Menurut Klein and Eliakim (2010) IBD juga dapat disebabkan oleh faktor penggunaan obat-obatan *Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID) yang digunakan dalam jangka waktu yang lama. Salah satu dari obat-obatan NSAID ialah indometasin. Menurut Taiwo and Conteh (2008), indometasin ialah obat NSAID yang digunakan untuk menurunkan respon inflamasi oleh hormon indolik, serotonin dan triptofan. Digunakan untuk pengobatan rheumatoid arthritis, penyakit sendi dan muskuloskeletal. Namun karena tingginya efek samping, indometasin tidak lagi digunakan sebagai obat analgesik dan antipiretik. Menurut Harirforoosh *et al.* (2013), NSAID memiliki efek samping terhadap saluran pencernaan dan ginjal, namun pasien masih mampu mentolerir konsumsi NSAID dengan dosis terapeutik dalam jangka waktu pendek. Namun apabila NSAID digunakan dalam jangka waktu yang lama akan menyebabkan efek samping terutama pada saluran pencernaan. Efek samping ringan penggunaan NSAID antara lain ialah dispepsia, muntah, dan nausea. Sedangkan efek berat yang disebabkan oleh NSAID antara lain lesi dan inflamasi pada saluran pencernaan.

Penggunaan obat-obatan NSAID seperti indometasin dalam jangka waktu yang pendek dan panjang dapat menyebabkan inflamasi baik pada manusia maupun hewan coba. Selain itu terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi patogenesis lesi di intestinal seperti defisiensi prostaglandin, asam empedu, dan

flora normal intestinal (Takeuchi, *et al.*, 2003). Indometasin bekerja dengan cara menghambat pembentukan *cyclooxygenase-1* (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin di intestinal. Penurunan produksi prostaglandin dapat menyebabkan penurunan produksi mukus di intestinal. Penurunan produksi mukus menyebabkan terganggunya barrier mukosa di intestinal sehingga memudahkan mikroflora memasuki intestinal. Antigen yang masuk ke dalam intestinal menyebabkan aktivasi makrofag untuk memfagositosis antigen, namun makrofag bekerja dengan cara melepaskan molekul radikal bebas (ROS). Produksi radikal bebas yang berlebih dapat mengaktivasi NF-kB dan fosforilasi inhibitor NF-kB (IkB) yang bergerak ke arah nukleus dan mengekspresikan sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Podolsky, 2002). Pembentukan ROS yang berlebih dapat menyebabkan kerusakan jaringan di sel ileum sehingga terjadi perubahan gambaran histopatologi ileum. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  merupakan sitokin inflamasi utama yang berperan dalam patogenesis IBD. Apabila produksi TNF- $\alpha$  mengalami peningkatan maka akan terjadi aktivasi dan migrasi neutrofil ke dalam jaringan sehingga terjadi kerusakan jaringan ileum (Dunlop and Malbert, 2004).

Pengobatan IBD selalu menggunakan terapi yang bersifat simptomatis berupa analgesik, antispasmodik, dan antidiare. Selain penggunaan obat-obatan yang bersifat simptomatis juga diberikan terapi seperti pemberian kortikosteroid, aminosalisilat, dan imuno modifier yang dimaksudkan untuk target organ. Apabila infeksi yang terjadi pada IBD sudah terlalu parah, maka penggunaan obat-obatan tersebut dapat memberikan efek samping yang tidak diinginkan. Oleh sebab itu dibutuhkan pengobatan alternatif yang memiliki sifat lebih aman dan tidak

menimbulkan efek samping dalam penggunaannya. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk pengobatan IBD ialah ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*).

Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) berasal dari keluarga *Convolvulaceae*. Didalam daun ubi jalar ungu terkandung beberapa senyawa fenolik seperti asam klorogenat, asam kafeat, asam 3,4-di-O-kafeoilkuinat, dan asam 3,4-di-O-kafeoilkuinat (Sulastri, *et al.*, 2013). Selain itu daun ubi jalar ungu terkandung senyawa polifenol dan flavonoid yang tinggi. Kandungan flavonoid yang tinggi dalam daun ubi jalar ungu dapat berperan sebagai senyawa antiinflamasi yang mampu untuk menghambat pembentukan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Yoshimoto, 2007). Daun ubi jalar ungu diketahui memiliki kandungan polifenol yang lebih tinggi dibandingkan sayuran lain seperti kentang, kandungan polifenol inilah yang berperan sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan berperan dalam mengurangi pembentukan radikal bebas sehingga dapat mengurangi kerusakan jaringan akibat radikal bebas (Supriyono, 2008). Daun ubi jalar ungu juga dikenal dengan kandungan antosianinnya yang tinggi seperti sianidin dan peonidin. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, antosianin dapat digunakan sebagai pengobatan hipertensi, gangguan mata, infeksi bakteri, dan diare (Sugata, *et al.*, 2015).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) terhadap tikus model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pengamatan ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi ileum tikus setelah diinduksi oleh indometasin.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang diangkat ialah:

1. Apakah pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) berpengaruh terhadap perubahan ekspresi TNF- $\alpha$  ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin?
2. Apakah pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) berpengaruh terhadap perubahan gambaran histopatologi ileum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin?

## 1.3. Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dengan umur 8-12 minggu dan berat badan 150 – 200 gram dan telah mendapatkan sertifikat persetujuan layak etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (**lampiran 1**).
2. Model penyakit IBD pada hewan tikus dilakukan dengan cara pemberian indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB secara peroral (po) dan dilarutkan menggunakan 1 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% selama 1 hari.
3. Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) yang digunakan ialah daun ubi jalar ungu yang dikeringkan dan dilakukan ekstrak dengan metode maserasi etanol yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.



4. Terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu diberikan kepada hewan coba dengan dosis 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB secara per oral 1 kali sehari selama 7 hari (Riansyah, *et al.*, 2015).
5. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini ialah ekspresi TNF- $\alpha$  dengan metode imunohistokimia dan gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan HE.

#### 1.4. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini ialah :

1. Mengetahui perubahan ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin setelah pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*).
2. Mengetahui perubahan gambaran histologi pada ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin setelah pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*).

#### 1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap perubahan ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histologi ileum tikus model IBD hasil induksi indometasin serta membuktikan bahwa ekstrak etanol daun ubi jalar ungu bermanfaat sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan yang dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif penyakit *Inflammatory Bowel Disease* (IBD).

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. *Inflammatory Bowel Disease* (IBD)

#### 2.1.1. Etiologi

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) merupakan penyakit yang menyebabkan inflamasi akut pada saluran pencernaan terutama usus halus dan kolon (Aulanni'am, *et al.*, 2011). *Inflammatory Bowel Disease* terbagi menjadi dua jenis yaitu *Ulcerative Colitis* (UC) dan *Crohn Disease* (CD). *Inflammatory Bowel Disease* itu sendiri dibedakan berdasarkan perbedaan lokasi inflamasi dan gambaran histologi (Bamias, *et al.*, 2005). *Crohn Disease* (CD) merupakan salah satu jenis IBD yang menyebabkan terjadinya lesi pada saluran pencernaan dan umumnya ditemukan pada bagian duodenum, jejunum, ileum terminalis, dan sekum. Sedangkan pada *Ulcerative Colitis* (UC) terjadi lesi pada area kolon, biasanya sering dijumpai pada area rektum dan proksimal rektum (Klein and Eliakim, 2010). Manifestasi klinis IBD pada anjing tidak terlalu spesifik. Gejala klinis yang terlihat antara lain ialah penurunan berat badan, nyeri abdominal, dan diare kronik. Beberapa gejala klinis yang disertai komplikasi dapat terjadi *ascites* (apabila mengalami hipoalbumemia) dan perdarahan saluran gastrointestinal (Cerquetella, *et al.*, 2010).

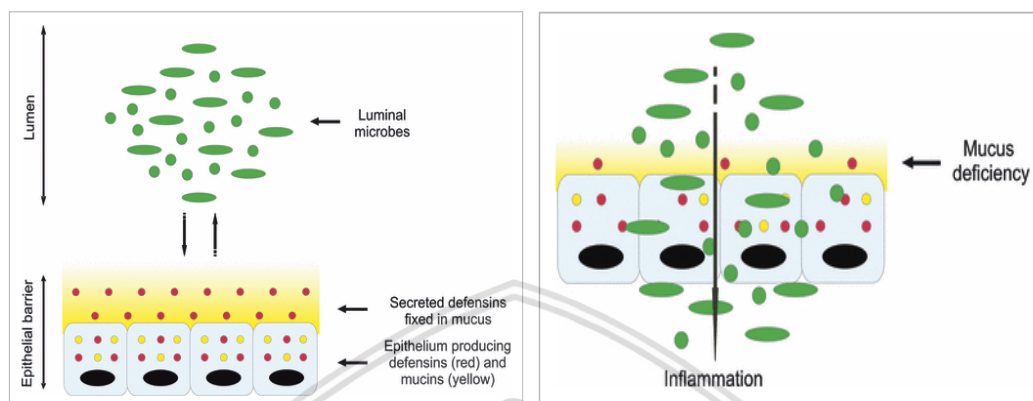
*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) disebabkan oleh infeksi bakteri patogen dan virus pada saluran pencernaan. Dalam penelitian lain juga menyebutkan bahwa IBD dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti lingkungan, penurunan sistem imun, dan ketidakseimbangan flora normal dalam intestinal (Kazuhide, *et al.*, 2009). Selain itu IBD juga dapat disebabkan oleh

faktor penggunaan obat-obatan *Non Steroid Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID) seperti aspirin, indometasin, ketoprofen, ibuprofen, dan NSAID lainnya yang digunakan dalam jangka waktu yang lama (Klein and Eliakim, 2010). Penggunaan obat-obatan NSAID seperti indometasin dalam jangka waktu yang pendek dan panjang dapat menyebabkan inflamasi baik pada manusia maupun hewan coba. Selain itu terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi patogenesis di intestinal seperti defisiensi prostaglandin, asam empedu, dan gangguan keseimbangan flora normal intestinal (Takeuchi, *et al.*, 2003).

### 2.1.2. Patomekanisme

*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) belum diketahui secara pasti penyebabnya, namun menurut Frolkis (2012), IBD juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu salah satunya penggunaan obat NSAID. Obat-obatan NSAIDs yang diserap oleh sel epitel ileum dapat menghambat produksi *cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2) yang akan menghambat produksi prostaglandin (PGE<sub>2</sub>), menyebabkan penurunan produksi mukus dan peningkatan motilitas usus. Perlindungan primer terhadap penetrasi mikroba dan patogen ke lamina propria adalah sel epitel dan mukus. *Barrier* mukus membentuk matrix yang dapat mencegah bakteri penetrasi ke sel epitel. Selain itu berperan sebagai pertahanan imun non spesifik, dengan menurunkan aktivasi limfosit (Sun *et al.*, 2016). Obat-obatan NSAID seperti indometasin dapat menghambat fosforilasi oksidatif *Adenosin Triphosphat* (ATP) di mitokondria. Penghambatan ATP dapat menyebabkan terjadinya apoptosis sel yang kemudian menghasilkan ROS dalam jumlah yang cukup banyak. Kandungan ROS yang

berlebihan dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan epitel ileum (Takeuchi, *et al.*, 2003). Patogenesis IBD dapat dilihat pada **gambar 2.1**.



**Gambar 2.1.** Patogenesis *Inflammatory Bowel Disease*. Fungsi normal *barrier intestinal mucosa* (kiri) dan gangguan *barrier intestinal mucosa* pada IBD (kanan) (Gersemann, *et al.*, 2012).

Penetrasi bakteri pada sel epitel juga akan mengaktivasi sel makrofag. Makrofag akan teraktivasi dan melepaskan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Peningkatan ROS dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif, stres oksidatif merupakan kondisi yang disebabkan oleh peningkatan ROS pada sel dan jaringan sehingga sistem antioksidan tubuh tidak mampu untuk menetralisir. Peningkatan aktivitas ROS akan dapat menyebabkan fosforilasi inhibitor NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) yang disertai dengan aktivasi NF $\kappa$ B. *Nuclear Factor Kappa B* (NF $\kappa$ B) kemudian akan mengalami proses transkripsi yang berperan dalam respon inflamasi yang terjadi di nukleus. Di dalam nukleus, NF $\kappa$ B akan berikatan dengan target gen dan menstimulasi terjadinya inflamasi dengan cara menginisiasi pelepasan sitokin proinflamasi yaitu TNF- $\alpha$ . Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  yang berlebihan akan menyebabkan aktivasi neutrofil dan produksi enzim protease yang berperan dalam proses inflamasi (Giugliano, *et al.*, 2006).

### 2.1.3. Ekspresi TNF- $\alpha$ pada *Inflammatory Bowel Disease*

*Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) merupakan sitokin inflamasi yang diproduksi oleh makrofag dan teraktivasi oleh sel T yang banyak berperan dalam sistem imun. *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) memiliki peran penting dalam melakukan inisiasi dan regulasi sitokin-sitokin lainnya ketika terjadi reaksi inflamasi. Selain itu TNF- $\alpha$  juga berperan dalam proliferasi sel, apoptosis, diferensiasi, koagulasi, menstimulasi terjadinya inflamasi pada endotel, serta berperan sebagai mediator inflamasi (Baki, *et al.*, 2012). Ekspresi TNF- $\alpha$  akan mengalami peningkatan apabila terjadi reaksi inflamasi akut. *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) berperan sebagai mediator antara respon imun spesifik dan proses inflamasi. Dalam beberapa penelitian, ekspresi TNF- $\alpha$  dapat digunakan sebagai indikator terhadap sel-sel yang mengalami apoptosis, nekrosis, dan stres oksidatif (Popa, *et al.*, 2007).

*Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) dapat teraktivasi oleh berbagai faktor seperti saat antigen dikenali oleh makrofag, makrofag akan teraktivasi dan melepaskan *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan aktivitas ROS akan menyebabkan fosforilasi inhibitor NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) yang disertai dengan aktivasi NF $\kappa$ B. *Nuclear Factor Kappa B* (NF $\kappa$ B) kemudian akan mengalami proses transkripsi yang berperan dalam respon inflamasi yang terjadi di nukleus. Mekanisme aktivasi TNF- $\alpha$  diinduksi oleh NF $\kappa$ B. *Nuclear Factor Kappa B* (NF $\kappa$ B) merupakan protein faktor transkripsi yang berperan penting dalam proses inflamasi. Adanya antigen didalam tubuh akan diterima oleh reseptor *Toll-like receptor 4* (TLR4) yang selanjutnya akan menyebabkan aktivasi dari NF $\kappa$ B dan

makrofag. Makrofag kemudian akan mensekresikan sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6, dan IL-12. Pada saat yang bersamaan makrofag akan memproduksi ROS dalam jumlah yang besar sebagai respon inflamasi (Balmus, *et al.*, 2016).

#### **2.1.4. Histopatologi Ileum pada *Inflammatory Bowel Disease***

Usus halus terbagi menjadi tiga bagian yaitu duodenum, jejunum, dan ileum. Ileum memiliki vili yang berbentuk seperti ibu jari dan memiliki kelenjar *liberkhun* yang sedikit serta terletak pada bagian akhir usus halus. Ileum terdiri atas vili-vili yang berbentuk menyerupai ibu jari dengan ukuran yang bervariasi yaitu antara 1,0 - 1,5  $\mu\text{m}$ , tersusun atas sel epitel kolumnar, memiliki sel goblet dalam jumlah yang paling sedikit dibandingkan bagian usus lainnya, memiliki lapisan mukosa, submukosa, muskularis, dan serosa. Ileum memiliki ciri khusus dibandingkan dengan bagian intestinal lainnya yaitu adanya bentukan *payer's patches*. Sel epitel pada ileum tersusun atas filament aktin dan myosin yang berperan penting dalam proses pergerakan vili (Inamoto, *et al.*, 2008). Pada bagian bawah sel epitel terdapat lapisan lamina propria yang tersusun atas pembuluh darah, jaringan limfatik, dan leukosit. Sedangkan pada bagian submukosa terdiri atas jaringan ikat dan pembuluh limfatik. (Samuelson, 2007).

*Inflammatory Bowel Disease* dapat disebabkan oleh penggunaan obat-obatan NSAID seperti indometasin. Indometasin bekerja dengan cara menghambat pembentukan *cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin di intestinal. Penurunan produksi prostaglandin dapat menyebabkan penurunan produksi mukus di intestinal yang dapat memicu terjadinya penurunan barier intestinal



yang berperan dalam pertahanan jaringan ileum (Podolsky, 2002). Gambaran kerusakan kriptas dan villi pada ileum dapat dilihat pada **gambar 2.2**.



**Gambar 2.2.** Gambaran histologi ileum normal (Eroschenko and Fiore, 2013).

Inflamasi ileum yang diakibatkan oleh IBD ditandai dengan munculnya sel-sel radang, edema, dan kerusakan epitel serta villi dari ileum. *Inflammatory Bowel Disease* menyebabkan bentukan kriptas pada mukosa ileum mengalami distorsi, terjadi perubahan bentuk dan ukuran yang tidak beraturan, serta bentuk villi yang juga mengalami perubahan bentuk yang *irregular*. Selain itu juga terjadi perubahan pada lamina propria yang mengandung sel-sel inflamasi seperti limfosit dan sel plasma. Permukaan sel epitel yang mengalami IBD memiliki permukaan yang datar, fokal, erosi, dan ulseratif (Langner, *et al.*, 2013).

## 2.2. Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara dan ditenakan untuk digunakan sebagai hewan coba dalam kegiatan penelitian. Tikus putih merupakan hewan percobaan yang paling sering digunakan terutama pada

penelitian yang berbasis sistem pencernaan (Hofstetter, *et al.*, 2005). Percobaan yang dilakukan menggunakan tikus putih jantan sebagai hewan percobaan. Tikus jantan dipilih karena memberikan hasil penelitian yang lebih stabil tanpa dipengaruhi kebuntingan seperti halnya pada tikus betina. Tikus jantan diketahui memiliki sistem metabolisme yang lebih cepat dibandingkan dengan tikus betina. Tikus putih memiliki keunggulan dibandingkan dengan hewan coba yang lain, yaitu tikus putih yang tidak dapat muntah karena sistem anatomi khusus yang hanya dimiliki tikus (Hubrecht and Kirkwood, 2010).



**Gambar 2.3.** Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Hubrecht and Kirkwood, 2010).

Menurut Suckow *et al.* (2006), berikut merupakan klasifikasi tikus sebagai hewan percobaan :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Fammili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Species	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus laboratorium yang digunakan sebagai percobaan diberikan makan dan minum secara *ad libitum* dengan pencahayaan ruangan yang diatur 12 jam kondisi terang dan 12 jam kondisi gelap. Tikus putih memiliki sifat yang sensitif terhadap cahaya, sehingga pengaturan cahaya didalam ruangan sebaiknya tidak melebihi 50 lux (Hubrecht and Kirkwood, 2010).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang digunakan sebagai model IBD dalam penelitian ini ialah tikus putih jantan dari galur wistar. Tikus putih jantan dipilih karena sifat hormon yang lebih stabil dibandingkan tikus betina (Hubrecht and Kirkwood, 2010). Tikus putih model IBD dihasilkan dengan cara menginduksi obat-obatan NSAID seperti indometasin. Indometasin bekerja dengan cara menghambat pembentukan *cyclooxygenase-1* (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin di intestinal dan *cyclooxygenase-2* (COX-2) sehingga memicu terjadinya ulser pada intestinal termasuk ileum (Klein and Eliakim, 2010). Dosis indometasin yang diberikan agar menghasilkan hewan model IBD pada saluran pencernaan termasuk ileum ialah 15 mg/kg BB yang diberikan secara per oral (Aulannia'am, *et al.*, 2012). Indometasin memiliki LD50 sebesar 21,5 mg/kg BB selama 12 jam dan dosis terapi ED50 indometasin ialah 2,95 mg/kg BB, sehingga dosis terapi sebesar 15 mg/kg BB aman untuk digunakan pada tikus (Taiwo and Conteh, 2008).

### **2.3. Efek Indometasin pada Ileum Tikus**

Pemberian indometasin dapat meningkatkan aktivitas radikal bebas yang dapat menyebabkan fosfolirasi inhibitor NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B) yang disertai dengan aktivasi NF $\kappa$ B. Aktivasi NF $\kappa$ B akan menginisiasi pelepasan sitokin proinflamasi

yaitu  $\text{TNF-}\alpha$  (Campbell, *et al.*, 2006). Indometasin bekerja dengan cara menghambat pembentukan *cyclooxygenase-1* (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin di intestinal dan *cyclooxygenase-2* (COX-2). *Cyclooxygenase-1* (COX-1) dapat bekerja dengan menekan produksi COX-2, sehingga mampu untuk menghasilkan  $\text{PGE}_2$  yang dapat menghambat migrasi neutrofil, namun karena indometasin dapat menghambat *cyclooxygenase-2* (COX-2) maka produksi  $\text{PGE}_2$  dapat ditekan (Takeuchi, *et al.*, 2003).

Penurunan produksi prostaglandin dapat menyebabkan penurunan produksi mukus di intestinal. Penurunan produksi mukus mengakibatkan penurunan barier mukosa di intestinal yang menyebabkan antigen mudah masuk ke intestinal. Antigen yang masuk ke dalam intestinal menyebabkan aktivasi makrofag untuk memfagositosis antigen, namun makrofag bekerja dengan cara melepaskan molekul radikal bebas (ROS). Produksi radikal bebas yang berlebih dapat mengaktivasi  $\text{NF}\kappa\text{B}$  dan fosforilasi inhibitor  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (I $\kappa$ B) dan mengekspresikan sitokin inflamasi seperti  $\text{TNF-}\alpha$  (Podolsky, 2002).

Peningkatan produksi  $\text{TNF-}\alpha$  akan menyebabkan neutrofil menjadi teraktivasi dan bermigrasi ke dalam jaringan. Migrasi neutrofil akan mempengaruhi kerusakan sel epitel di ileum dan menyebabkan perubahan gambaran histopatologi ileum. *Tumor Necrosis Factor* ( $\text{TNF-}\alpha$ ) merupakan sitokin inflamasi utama yang berperan dalam patogenesis IBD. Apabila produksi  $\text{TNF-}\alpha$  mengalami peningkatan maka akan terjadi kerusakan jaringan ileum (Dunlop and Malbert, 2004).



## 2.4. Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*)

### 2.4.1. Taksonomi

Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) merupakan tanaman herba yang merayap, dengan warna daun hijau cerah dan ungu. Daun ubi jalar ungu tersedia dalam jangka waktu yang lama, toleran terhadap hujan dan dapat tumbuh dalam berbagai zona ekologi (Mwanri, *et al.*, 2011). Ubi jalar ungu merupakan tanaman yang memiliki karakteristik merambat, daun hijau cerah atau ungu dengan pigmen berwarna ungu pada bagian tangkai dan jari-jari daun (Sugata, *et al.*, 2015). Kelompok flavonoid yang terdapat di dalam daun ubi jalar ungu ialah antosianin. Antosianin merupakan pigmen berwarna merah keunguan yang bersifat larut dalam senyawa polar. Dalam proses penggunaannya, daun ubi jalar ungu lebih sering dibuang dengan presentasi sebesar 95-98%. Daun ubi jalar ungu memiliki kandungan anti inflamasi dan antioksidan alami. Dalam beberapa penelitian menunjukkan bahwa kandungan fitokimia dalam daun ubi jalar ungu mengandung antioksidan yang mampu untuk melawan radikal bebas (Anita, *et al.*, 2006).



**Gambar 2.4.** Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) (Bachman, 2012).

Taksonomi dari tumbuhan daun ubi jalar ungu yang digunakan ialah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Solanceae
Famili	: Convolvulaceae
Genus	: <i>Ipomoea</i>
Species	: <i>Ipomoea batatas L.Lam</i>

#### 2.4.2. Kandungan Daun Ubi Jalar Ungu

Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) berasal dari keluarga *Convolvulaceae*. Didalam daun ubi jalar ungu terkandung beberapa senyawa fenolik seperti asam klorogenat, asam kafeat, asam 3,4-di-O-kafeoilkuinat, dan asam 3,4-di-O-kafeoilkuinat (Sulastri, *et al*, 2013). Kandungan fenolik pada umbi ubi jalar ungu ialah sebesar  $0,945 \pm 0,03$  g GAE/100 g (Truong, *et al.*, 2010). Sedangkan kandungan senyawa fenolik pada daun ubi jalar ungu rata-rata ialah sebesar 19,64 g GAE/100 g (Eleazu and Ironua, 2013). Selain itu daun ubi jalar ungu terkandung senyawa flavonoid yang tinggi. Kandungan flavonoid yang tinggi dalam daun ubi jalar ungu dapat berperan sebagai senyawa anti inflamasi yang mampu untuk menghambat pembentukan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Yoshimoto, 2007). Kandungan flavonoid dalam daun ubi jalar ungu dapat berperan sebagai inhibitor yang kuat terhadap senyawa nitrogen reaktif, selain itu juga mampu meningkatkan aktifitas enzim siklooksigenase (Rachmi, *et al.*, 2010).



Daun ubi jalar ungu memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan bagian umbinya. Kandungan flavonoid pada setiap varietas memiliki perbedaan, kandungan rata-rata flavonoid pada berbagai jenis varietas ialah antara 15,4 – 59,79 g QE/100 g (Fidrianny, *et al.*, 2013). Sedangkan kandungan flavonoid pada umbi ubi jalar ungu pada berbagai variatas ialah antara  $50,77 \pm 0,05$  mg QE/100 g (Eleazu and Ironua, 2013).

Flavonoid dalam ubi jalar ungu seperti quercetin juga dapat bekerja sebagai antiinflamasi pada intestinal. Quercetin yang terserap dalam tubuh akan diubah menjadi derivat yang lebih kecil seperti asam glukorinik quercetin. Quercetin dan derivatnya stabil dalam asam lambung dan mampu diserap hingga ke intestinal. Quercetin dapat menghambat terjadinya inflamasi dengan memodulasi produksi enzim *Cyclooxygenase* (COX) sehingga produksi prostaglandin dapat ditingkatkan (Li *et al.*, 2016).

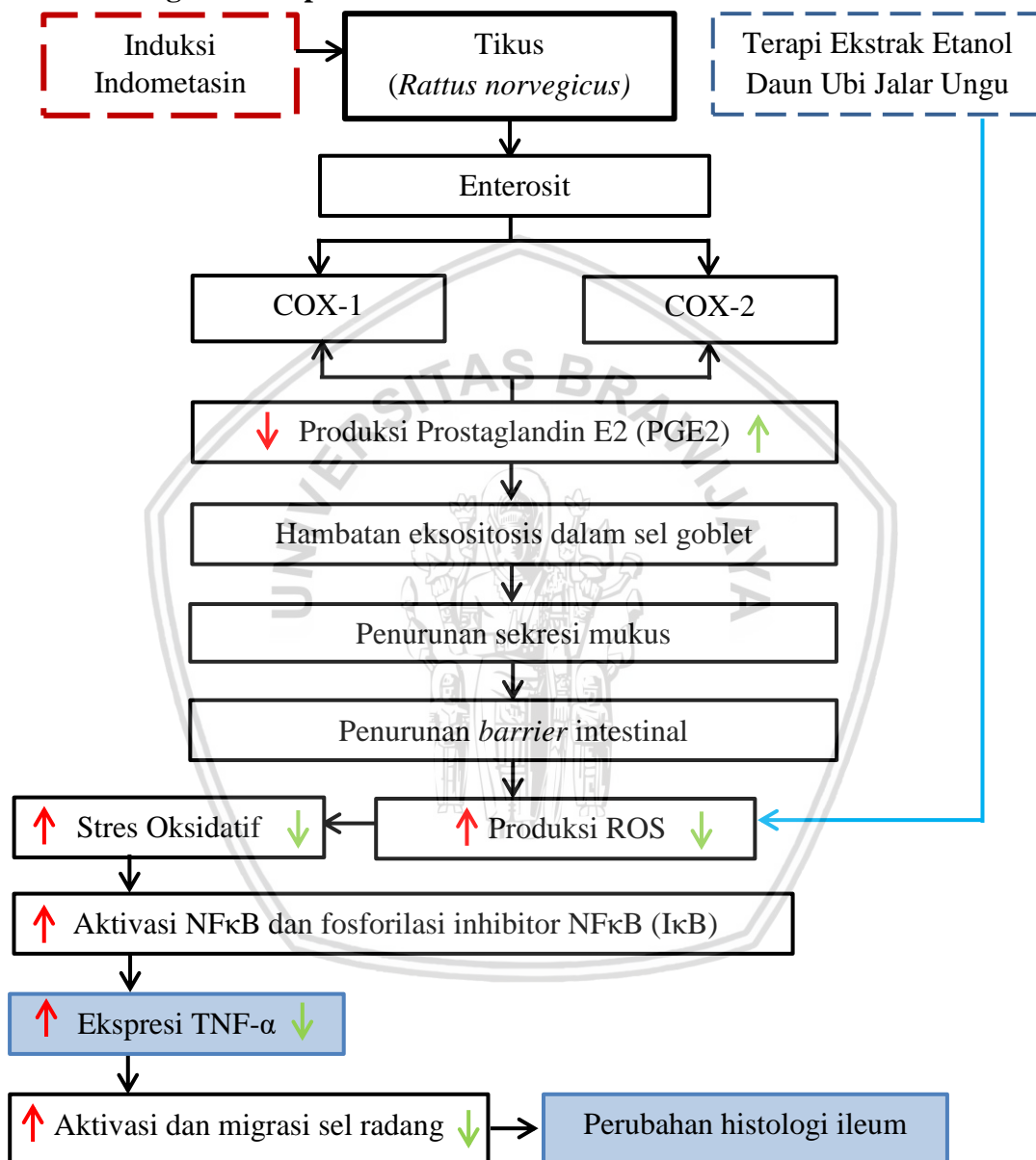
Daun ubi jalar ungu diketahui memiliki kandungan polifenol yang berperan sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan berperan dalam mengurangi pembentukan radikal bebas sehingga dapat mengurangi kerusakan jaringan akibat radikal bebas (Supriyono, 2008). Senyawa polifenol juga berperan sebagai antioksidan yang kuat dalam menekan stres oksidatif dengan cara menetralkan radikal bebas melalui pencegahan peroksidasi lipid (Wen, *et al.*, 2016). Polifenol memiliki kemampuan dalam memodulasi aktivitas asam arakidonat dalam memetabolisme enzim seperti *cyclooxygenase* (COX) dan *lipooxygenase* (LOX). Menghambat produksi enzim tersebut akan menyebabkan penurunan produksi prostaglandin yang dapat memicu terjadinya inflamasi (Hussain, *et al.*, 2016).

Daun ubi jalar ungu juga dikenal dengan kandungan antosianinnya yang tinggi seperti sianidin dan peonidin. Antosianin merupakan kelompok pigmen yang berperan dalam pemberian warna ungu pada daun. Antosianin dikenal dengan kemampuan antioksidannya yang tinggi dalam menangkap radikal bebas dan menghambat terjadinya peroksidasi pada lemak. Berdasarkan penelitian diketahui bahwa kandungan antosianin pada umbi ubi jalar ungu ialah sebesar 110,51 mg/100g (Ginting, *et al.*, 2011).



### BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1.** Kerangka Konseptual Penelitian

Keterangan gambar :

- Induksi Indometasin : Induksi Indometasin
- Terapi : Terapi
- Mekanisme dalam tubuh tikus : Mekanisme dalam tubuh tikus
- Variabel yang diteliti : Variabel yang diteliti
- ↑ : Efek induksi indometasin
- ↓ : Efek terapi

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diinduksi menggunakan indometasin yang berfungsi untuk menghambat enzim siklooksigenase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2) yang berfungsi dalam pembentukan prostaglandin. Induksi indometasin yang menghambat COX-1 dan COX-2. Penurunan produksi COX-1 menyebabkan penurunan produksi PGE<sub>2</sub> yang berfungsi sebagai vasokonstriksi pembuluh darah, penurunan produksi mukus yang menyebabkan hilangnya perlindungan usus. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) berperan dalam eksositosis sekresi mukus pada sel goblet. Di dalam sel granula sel goblet terdapat Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> dan H<sup>+</sup> dan HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pada granul mukus. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> bekerja dengan merombak granul mukus dengan cara menetralkan ion H<sup>+</sup> dan Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> dalam memicu terjadinya repulsi elektrostatis sehingga dapat merubah makromolekul mukus menjadi mukus dewasa (mature mucus). Gangguan produksi PGE<sub>2</sub> dapat menyebabkan gangguan transport HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sehingga menghalangi proses maturasi mukus, eksositosis dan sekresi mukus (Yang *et al.*, 2013).

Penurunan produksi mukus menyebabkan terganggunya barrier mukosa di intestinal sehingga memudahkan mikroflora memasuki intestinal. Hal inilah yang menyebabkan mikroflora masuk dan menyebabkan interaksi antara mukosa dan mikroflora yang dikenali sebagai antigen. Antigen yang masuk ke dalam intestinal menyebabkan aktivasi makrofag untuk memfagositosis antigen, namun makrofag bekerja dengan cara melepaskan molekul radikal bebas (ROS) seperti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, dan OH. Jumlah radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh inilah yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dalam tubuh. Stres oksidatif memicu fosforilasi inhibitor NFκB (IκB) dan aktivasi NFκB yang nantinya akan

bermigrasi ke nukleus dan mengaktifkan lebih banyak makrofag lainnya. Makrofag akan mengekspresikan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  yang berperan dalam patogenesis IBD. Peningkatan produksi TNF- $\alpha$  akan menyebabkan sel radang menjadi teraktivasi dan bermigrasi ke dalam jaringan. Migrasi sel radang akan mempengaruhi kerusakan sel epitel di ileum dan menyebabkan perubahan gambaran histopatologi ileum.

Daun ubi jalar ungu memiliki kandungan flavonoid dan polifenol yang tinggi. Kandungan flavonoid dalam daun ubi jalar ungu dapat berperan sebagai inhibitor yang kuat terhadap senyawa nitrogen reaktif selain itu juga mampu meningkatkan aktivitas enzim siklooksigenase (Rachmi, *et al.*, 2010). Selain itu daun ubi jalar ungu mampu untuk menghambat produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Menurut Chiao *et al.* (2008), kandungan lain yang ditemukan di daun ubi jalar ungu ialah polifenol yang bekerja sebagai agen antioksidan untuk melawan radikal bebas, polifenol juga berperan dalam penurunan stres oksidatif. Polifenol mengandung asam arakidonat yang berfungsi untuk memodulasi pembentukan enzim COX. Peningkatan produksi COX inilah yang nantinya mampu untuk meningkatkan produksi prostaglandin. Selain itu, antosianin juga berperan dalam melakukan penghambatan aktivasi NF $\kappa$ B. Penghambatan aktivasi NF $\kappa$ B dapat menyebabkan penghambatan dalam terbentuknya IKK (IkB kinase) yang berperan dalam mendegradasi IkB. Inhibitor NF $\kappa$ B (IkB) berperan dalam mengikat NF $\kappa$ B sehingga NF $\kappa$ B tetap dalam kondisi inaktif. Terhambatnya aktivasi dari NF $\kappa$ B akan menyebabkan hambatan dalam pembentukan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  sehingga mampu untuk menurunkan inflamasi pada

ileum (Miguel, 2011). Produksi TNF- $\alpha$  yang menurun dapat menyebabkan penurunan aktivitas sel radang dan mengurangi tingkat keparahan inflamasi sehingga kerusakan pada sel epitel dapat berkurang.

### 3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah dipaparkan, maka hipotesis yang dapat diajukan dalam penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.Lam) dapat mempengaruhi perubahan ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum tikus model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi dengan menggunakan indometasin.
2. Pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.Lam) dapat mempengaruhi perubahan inflamasi sehingga mampu untuk memperbaiki sel epitel yang rusak dan penurunan infiltrasi dari sel radang yang dapat dilihat di gambaran histopatologi.

## BAB 4. METODE PENELITIAN

### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2018 – Mei 2018. Pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Perawatan dan pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan preparat histopatologi dan TNF –  $\alpha$  dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang dan Laboratorium Kesima Medika, Malang.

### 4.2. Alat dan Bahan Penelitian

Alat pendukung yang digunakan dalam penelitian ini ialah *animal restrain*, kandang tikus, alat sonde, botol minuman, labu ukur, gelas ukur, timbangan, tabung *erlenmeyer*, corong kaca, pipet ukur, *scaple*, *pinset*, *bulb*, bunsen, oven, *spatula*, gunting, mikropipet, alat *sentrifuge*, pH meter, pH *indicator*, *cover glass*, *object glass*, thermometer, *vortex*, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*) dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan dengan usia antara 8 – 12 minggu dengan berat 150 – 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi). Bahan lainnya yang digunakan antara lain 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,



alkohol, aquades, NaCl fisiologis 0,9%, *neutral buffered formaline*, *xylol*, *paraffin*, para-formaldehid (PFA), etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% dan etanol 95%, *novocastra peroxidase block*, antibodi primer (*Rat Anti TNF-  $\alpha$* ), antibodi sekunder *rabbit anti rat*, *sterile water*, *novocastra post primary*, pewarna *Hematoxylin dan Eosin* dan pakan SP (standar).

#### 4.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Metode RAL dipilih karena dalam penelitian yang dilakukan menggunakan jenis data yang homogen dan faktor faktor luar tidak ikut diteliti dalam penelitian ini. Rancangan eksperimental yang digunakan sebagai penelitian sederhana dengan subyek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak. Tiap kelompok terdiri atas 4 ekor tikus. Kelompok 1 merupakan tikus yang tidak diberikan perlakuan apapun (kontrol negatif), kelompok 2 merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin (kontrol positif), kelompok 3 merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin dan diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 600 mg/ kg/ BB, kelompok 4 merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin dan diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 700 mg/ kg/ BB, kelompok 5 merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin dan diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 800 mg/ kg/ BB. Kerangka operasional rancangan penelitian dapat dilihat pada **lampiran 2**.

**Tabel 4.1.** Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok Tikus	Perlakuan
<b>A</b>	Tikus normal (kontrol negatif)
<b>B</b>	Tikus model IBD (kontrol positif)
<b>C</b>	Tikus model IBD + terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu 600 mg/kg/BB
<b>D</b>	Tikus model IBD + terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu 700 mg/kg/BB
<b>E</b>	Tikus model IBD + terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu 800 mg/kg/BB

#### 4.4. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) jantan *strain* wistar yang berumur 8 – 12 minggu, dengan berat badan 150 – 200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama 7 hari yang bertujuan untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan di laboratorium. Berdasarkan Kusrieningrum (2010), besar sampel dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$t (n-1)$	$\geq 15$	Keterangan :
$5 (n-1)$	$\geq 15$	$t$ = Jumlah perlakuan
$5n - 5$	$\geq 15$	$n$ = Jumlah ulangan yang diperlukan
$5n$	$\geq 20$	
$n$	$\geq 20/5$	
$n$	$\geq 4$	

Berdasarkan perhitungan rumus diatas maka dapat diketahui bahwa untuk 5 jenis kelompok perlakuan dibutuhkan jumlah ulangan paling sedikit sebanyak 4 kali dalam setiap kelompok. Sehingga hewan coba tikus yang dibutuhkan sebanyak 20 ekor.

#### 4.5. Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati dalam penelitian ini ialah :

Variabel bebas : Induksi indometasin dan dosis terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu sebesar 600 mg/kg/BB, 700 mg/kg/BB, dan 800 mg/kg/BB.

Variabel terikat : Ekspresi TNF- $\alpha$  dan gambaran histopatologi ileum tikus.

Variabel kontrol : Tikus, jenis kelamin, suhu, berat badan, kandang, pakan.

#### 4.6. Tahapan Penelitian

##### 4.6.1. Preparasi Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian diadaptasikan terhadap lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan pemberian makan dan minum secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan berupa pakan ayam. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan terdiri atas 4 ekor tikus. Tikus ditempatkan pada kandang dengan ukuran 30 x 45 x 30 cm dengan jumlah 5 buah, sesuai dengan tikus yang digunakan. Kandang diletakkan dalam kondisi yang bebas keributan, bebas dari asap industry, dan bahan polutan lainnya. Lantai kandang selalu dijaga kebersihan dan sanitasinya dengan dibersihkan setiap hari.

#### 4.6.2. Tatalaksana Pembuatan Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* dengan Induksi Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan pada tikus ialah sebesar 15 mg/kg/BB yang diberikan secara per oral (Aulanni'am, *et al.*, 2011). Berat badan tikus yang digunakan rata-rata sebesar 160 gram sehingga pemberian indometasin diberikan sebanyak 2,4 mg/tikus. Menurut Sholichah *et al.* (2012), dosis indometasin yang digunakan ialah sebesar 15 mg/kg/BB. Menurut Udobang *et al.* (2017), indometasin diberikan secara per oral dan sebelumnya dilarutkan bersamaan dengan 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> menggunakan air hangat. Berikut merupakan rumus yang digunakan untuk menentukan banyaknya indometasin dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> yang diperlukan sebagai pelarut untuk diberikan pada tikus.

Kebutuhan indometasin :  $15 \text{ mg/kg/BB} \times 0,16 \text{ kg} = 2,4 \text{ mg/tikus}$

Volume indometasin yang diberikan ialah sebanyak 2,4 mg indometasin yang dilarutkan dalam 1 mL air.

Indometasin dilarutkan dengan 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kemudian dihomogenkan. Dalam masing-masing tikus diberikan campuran indometasin dengan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sebanyak 1 mL. Larutan indometasin yang sudah jadi kemudian diberikan kepada tikus secara per oral dengan menggunakan sonde lambung. Tikus terlebih dahulu dilakukan penimbangan berat badan baik sebelum dan sesudah induksi indometasin untuk mengetahui perubahan berat badan tikus. Setelah dilakukan induksi indometasin, tikus kontrol positif akan menunjukkan gejala klinis seperti penurunan berat badan, diare, dan penurunan nafsu makan. Induksi indometasin akan menyebabkan kerusakan pada sel epitel usus dan perlu diinkubasi selama 24 jam untuk memberikan efek yang diinginkan yaitu tikus model *Inflammatory*

*Bowel Disease*. Perhitungan kebutuhan indometasin pada tikus secara lengkap dapat dilihat di **lampiran 3**.

#### **4.6.3. Pembuatan Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*)**

Daun ubi jalar ungu didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (Balitkabi), Malang. Daun ubi jalar ungu dikeringkan dengan menggunakan oven yang kemudian di blender halus. Serbuk daun ubi jalar ungu diekstrak dengan metode maserasi dengan menggunakan etanol 70% dengan jumlah perbandingan (100 gram serbuk daun ubi jalar ungu dalam 1000 mL etanol 70%) yang dilakukan selama 48 jam dan kemudian disaring dengan *Buchner*. Proses maserasi dilakukan berulang hingga menghasilkan filtrat yang jernih. Filtrat yang sudah didapatkan kemudian diuapkan bahan pelarut alkoholnya dengan suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator*, kemudian dilakukan proses pengeringan dengan menggunakan oven sehingga didapatkan ekstrak berbentuk pasta. Proses pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dapat dilihat secara lengkap pada **lampiran 4**.

#### **4.6.4. Pemberian Terapi Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) pada Hewan Model IBD**

Subyek penelitian dibagi menjadi 5 kelompok secara acak. Tiap kelompok terdiri atas 4 ekor tikus. Metode pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan secara per oral selama 7 hari. Kelompok C merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin dan diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 600 mg/kg/ BB, kelompok D merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin dan diberikan terapi ekstrak

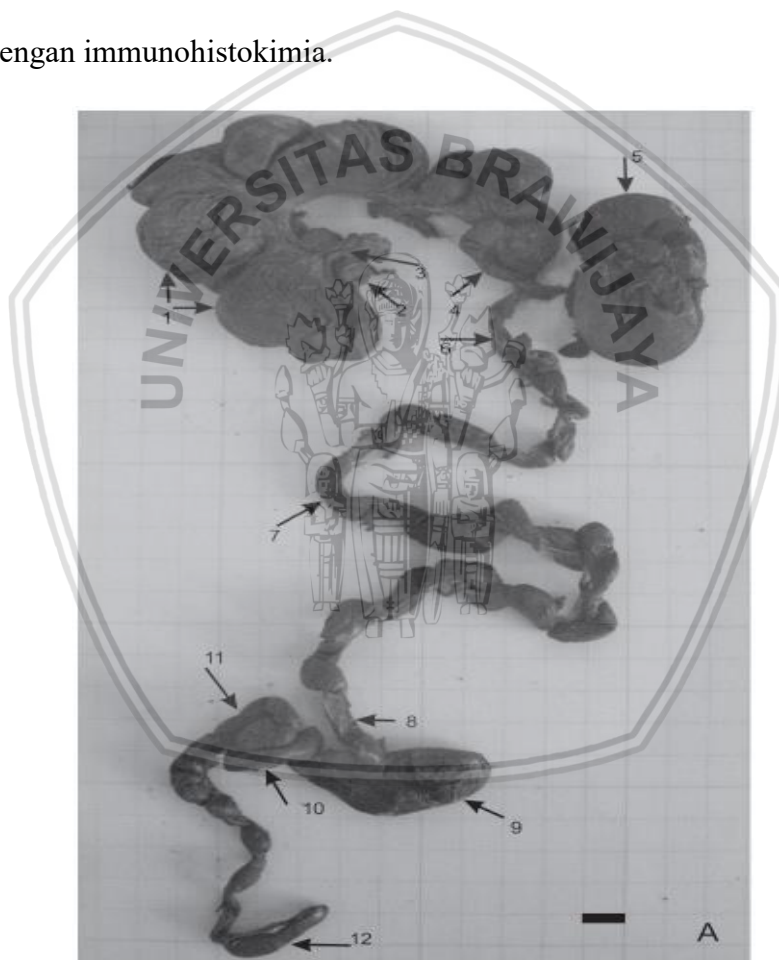
etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 700 mg/kg/ BB, kelompok E merupakan tikus yang diinduksi dengan menggunakan indometasin dan diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 800 mg/kg/BB. Terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu diberikan 24 jam setelah induksi indometasin dan diberikan selama 7 hari secara berturut-turut. Perhitungan dosis terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu secara lengkap dapat dilihat pada **lampiran 5**.

#### **4.6.5. Preparasi Ileum Tikus untuk Pembuatan Preparat Histopatologi dan Preparat Immunohistokimia**

Pengambilan organ ileum tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-9 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Langkah awal yang harus dilakukan ialah melakukan eutanasi menggunakan teknik *dislokasio cervicalis* pada tulang leher dan kemudian dilakukan pembedahan. Menurut AVMA (2013), *dislokasio cervicalis* merupakan metode yang sering digunakan pada hewan yang berukuran kecil seperti tikus. *Dislokasio cervicalis* memiliki kelebihan seperti menginduksi kehilangan kesadaran tikus secara cepat, tidak mengkontaminasi jaringan, tidak menggunakan bahan kimia, dan menyebabkan kematian tikus secara cepat. Tikus diposisikan dengan posisi rebah dorsal yang kemudian dilakukan pembedahan pada bagian abdominal. Kemudian diambil sampel organ ileum, diisolasi, dan dipotong pada bagian terminal. Ileum merupakan bagian terakhir dari usus halus, terletak setelah saluran jejunum. Ileum terletak diantara saluran jejunum dan *ileocaecal junction*. Ileum dan jejunum secara sekilas sulit untuk dibedakan, namun ileum diketahui memiliki diameter lumen dan dinding yang lebih kecil dibandingkan jejunum. Selain itu ileum tikus memiliki panjang  $61.40 \pm 7.68$  mm (Scopin, *et al.*, 2011).



Organ ileum kemudian dibersihkan dengan menggunakan NaCl fisiologis 0,9%. Kemudian organ ileum dimasukkan kedalam larutan *Neutral Buffered Formaline* yang berfungsi sebagai cairan fiksasi, yaitu dengan cara mengeluarkan cairan yang terdapat pada organ ileum agar dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Kemudian setelah dimasukkan ke *Neutral Buffered Formaline*, dilanjutkan dengan pembuatan preparat histopatologi dan pengukuran ekspresi TNF- $\alpha$  dengan immunohistokimia.



**Gambar 4.1.** Anatomi gastrointestinal tikus (*Rattus norvegicus*), 1– sac-like compartments; 2 – diverticulum lambung; 3 – oesophagus; 4 – pars pylorica; 5 – hati; 6 – duodenum; 7 – jejunum; 8 – ileum; 9 – caecum; 10 – colon ascendens; 11 – colon descendens; 12 – rektum (Scopin *et al.*, 2011).



#### 4.6.6. Pembuatan Preparat Histopatologi dengan Pewarnaan Hematoksili-Eosin (HE)

Pembuatan preparat histologi terdiri atas beberapa tahap antara lain ialah fiksasi, dehidrasi, penjernihan (*clearing*), infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan pada *object glass*, dan pewarnaan HE. Fiksasi berfungsi untuk melakukan inaktivasi enzim degradasi sehingga dapat mencegah kerusakan jaringan yang lebih lanjut serta berfungsi untuk menjaga kontinuitas jaringan. Fiksasi dilakukan dengan perendaman jaringan organ ke dalam larutan NaCl fisiologis yang kemudian dilanjutkan dengan perendaman *Neutral Buffered Formaline* selama 24 jam. Setelah melalui proses fiksasi, tahapan yang dilakukan selanjutnya ialah proses dehidrasi.

Tahapan dehidrasi dilakukan untuk mengeluarkan cairan yang terdapat di dalam jaringan sehingga rongga pada sel dapat digantikan dengan parafin cair. Proses dehidrasi dilakukan dengan perendaman jaringan dengan menggunakan metode alkohol bertingkat yang dimulai dengan alkohol 70% selama 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan perendaman alkohol 80% selama 2 jam, perendaman jaringan ke dalam alkohol 90% selama 20 menit dan alkohol absolut selama 20 menit.

Tahapan yang dilakukan ialah proses penjernihan (*clearing*) dengan cara memindahkan jaringan yang sudah direndam dalam etanol absolut ke dalam larutan xylol I selama 20 menit dan xylol II selama 30 menit. Proses *clearing* berfungsi untuk menghilangkan sisa alkohol yang masih melekat pada jaringan.

Tahapan yang dilakukan selanjutnya ialah dengan melakukan infiltrasi parafin cair. Tujuan dilakukannya tahap infiltrasi parafin ialah untuk menggantikan bahan dehidran pada sel dengan parafin. Proses infiltrasi parafin pada pembuatan preparat meliputi tiga tahap. Tahap pertama yaitu dengan merendaman preparat pada cairan parafin 1, kemudian dipanaskan pada oven selama sekitar 1 jam. Langkah selanjutnya yaitu merendaman preparat pada cairan parafin 2, kemudian dipanaskan pada oven selama sekitar 1 jam. Selanjutnya, dilakukan perendaman pada cairan parafin 3 dan kemudian dipanaskan pada oven selama sekitar 1 jam.

Proses pembuatan histologi yang selanjutnya ialah tahap *embedding*. Proses *embedding* berfungsi untuk mengisi jaringan dengan media *embedding* sehingga jaringan menjadi terikat dan mempertahankan bentuk aslinya. Tahapan ini dilakukan dengan cara merendam jaringan ke dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam cetakan, kemudian dibiarkan selama beberapa saat hingga parafin menjadi padat. Proses pemotongan preparat dilakukan dengan cara memasukkan hasil *embedding* pada *block holder*.

Proses pemotongan (*sectioning*) dilakukan dengan cara mengatur tingkat ketebalan preparat dengan rata-rata ukuran  $\pm 4 - 5 \mu\text{m}$  dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan kemudian dipindahkan ke dalam air hangat dengan suhu  $38 - 40^{\circ}\text{C}$  dengan cara membuka lipatan dan meluruskan bagian kerutan halus pada irisan. Irisan yang sudah sempurna kemudian diletakkan pada *object glass*. Irisan yang terpilih kemudian diletakkan di atas *hot plate* dengan suhu antara  $38 - 40^{\circ}\text{C}$  hingga mulai mengering. Preparat yang sudah selesai disimpan ke dalam

inkubator dengan suhu 38 – 40 °C yang kemudian siap untuk dilakukan pewarnaan HE.

Pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) terdiri atas zat warna antara lain *hematoxylin* dan *eosin*. Zat hematoksin memberikan warna biru pada material basa seperti inti sel sedangkan zat eosin akan memberikan warna merah pada material asam seperti sitoplasma. Proses pewarnaan diawali dengan melakukan proses deparafinasi dengan menggunakan xylol. Deparafinasi bertujuan untuk menghilangkan sisa parafin yang terdapat dalam jaringan. Deparafinasi dilakukan dengan cara perendaman sampel pada larutan Xylol I dan II masing-masing selama 5 menit. Proses selanjutnya yang dilakukan ialah dengan melakukan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol. Alkohol yang digunakan ialah mulai dari alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan dengan waktu masing-masing 5 menit. Proses rehidrasi bertujuan untuk mengembalikan kandungan air dalam jaringan. Kemudian preparat dibersihkan dengan menggunakan aquades. Setelah itu dilakukan proses pewarnaan dengan menggunakan pewarna *hematoxylin* selama 5 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan air mengalir selama kurang lebih 10 menit, dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan aquades selama 5 menit. Kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan pewarna *eosin* selama 10 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan air mengalir selama kurang lebih 5 menit, dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan aquades selama 5 menit.

Setelah dilakukan proses pewarnaan maka dilanjutkan dengan proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari konsentrasi 70%, 80%, 90% dan 95% selama beberapa detik. Kemudian proses yang dilakukan selanjutnya ialah perendaman dengan menggunakan alkohol absolut I, II selama 5 menit. Dilakukan proses penjernihan (clearing) dengan menggunakan xylol I, II selama 5 menit. Proses terakhir dilakukan perekatan menggunakan entellan dan ditutup dengan menggunakan *cover slip*. Hasil histologi yang dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus BX51) dengan perbesaran 400x dan 1000x. Pengamatan histopatologi ileum dilakukan dengan mengamati kerusakan sel epitel dan infiltrasi sel inflamasi.

#### **4.6.7. Penentuan Ekspresi TNF- $\alpha$ dengan Immuno-histokimia**

Pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk melakukan identifikasi terhadap komponen jaringan dengan menggunakan interaksi antara antigen target dengan antibodi spesifik. Proses pertama yang dilakukan dengan cara melakukan deparafinisasi yang bertujuan untuk menghilangkan parafin di jaringan dengan cara merendam dengan xylol. Proses selanjutnya yang dilakukan ialah dengan melakukan proses rehidrasi dengan menggunakan alkohol. Alkohol yang digunakan ialah mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% secara berurutan dengan waktu masing-masing 5 menit. Proses rehidrasi bertujuan untuk mengembalikan kandungan air dalam jaringan. Preparat kemudian dibersihkan dengan menggunakan PBS dengan pH 7,4. Kemudian dilanjutkan dengan deperoksidasi endogen dengan menggunakan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan dibilas dengan menggunakan PBS pH 7,4. Kemudian dilakukan dengan proses *blocking*

menggunakan BSA 1% selama 30 menit dengan suhu ruangan, kemudian dibilas dengan PBS pH 7,4. Preparat kemudian direaksikan dengan menggunakan antibodi primer yaitu *rat-anti-rat TNF- $\alpha$*  selama 24 jam dengan suhu 4°C dan dicuci dengan menggunakan PBS pH 7,4. Selanjutnya preparat direaksikan dengan menggunakan antibodi sekunder, *rabbit anti rat* selama 1 jam dengan suhu 27°C yang kemudian dibilas dengan menggunakan PBS pH 7,4. Ditambahkan substrat kromagen DAB (3,3 – *diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10 menit. Proses selanjutnya ialah dengan melakukan pewarnaan menggunakan *mayer hematoxylin* sampai terlihat berwarna biru dan kemudian dibersihkan dengan air mengalir dan aquades selama 5 menit dan dikeringkan dengan suhu ruangan. Terakhir dilakukan proses *mounting* dengan larutan entellan dan ditutup menggunakan *cover slip* (Ramos, 2005).

Ekspresi TNF- $\alpha$  ditandai dengan terbentuknya warna coklat pada area sitoplasma. Ekspresi TNF- $\alpha$  dianalisa dengan membandingkan distribusi ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus kontrol positif dengan tikus perlakuan. Hasil ekspresi TNF- $\alpha$  diamati dengan menggunakan mikroskop (Olympus BX51) dengan pembesaran 400x. Ekspresi TNF- $\alpha$  dilakukan dengan cara pengamatan 5 bidang pandang dengan penilaian rata-rata persentase area menggunakan program *Immuno Ratio*. Ekspresi TNF- $\alpha$  dianalisa dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* yang kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey  $\alpha=5\%$ , yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan nyata pada tiap kelompok penelitian.

#### 4.7. Analisa Data

Data yang didapatkan dari penelitian ialah dengan metode data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dari pengamatan histopatologi organ ileum yang dilihat dari kerusakan epitel ileum dan infiltrasi sel radang yang kemudian dianalisis secara deskriptif serta membandingkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada sediaan histopatologi ileum tikus kontrol dengan ileum tikus tiap perlakuan. Data kuantitatif diperoleh dari jumlah sel yang mengekspresikan TNF- $\alpha$  yang kemudian ditabulasi dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan dianalisa dengan menggunakan metode *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan *software SPSS 16 for Windows* yang bertujuan dengan mengetahui perbedaan tiap perlakuan. Apabila terjadi perbedaan nyata pada tiap perlakuan, metode dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Tukey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ)  $\alpha = 0,05$  yang bertujuan untuk mengetahui presentasi perlakuan yang paling efektif (Kusriningrum, 2010).



## BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Tikus Model IBD (Inflammatory Bowel Disease)

Manifestasi klinis dari penyakit IBD bervariasi tergantung pada lama terjadinya penyakit. Secara umum IBD dapat menimbulkan gejala seperti kelelahan, diare terus-menerus, rasa sakit abdomen, penurunan berat badan, dan demam. Munculnya diare berdarah dapat terjadi atau tidak terjadi sama sekali tergantung tingkat keparahan penyakit. Beberapa pasien dapat menyebabkan munculnya fistula atau abses abdomen. Diare dapat terjadi akibat sekresi cairan yang berlebihan, ketidakseimbangan absorpsi cairan, pertumbuhan bakteri, dan gangguan absorpsi garam empedu. Gejala klinis dari IBD dapat dikelompokkan menjadi 3 jenis yaitu, *mild*, *moderate*, dan *severe*. *Mild* IBD ditandai dengan pasien yang masih mampu dalam mentolerir diet pakan tanpa terjadi dehidrasi, keracunan, dan diare ringan. *Moderate* IBD ditandai dengan gejala klinis seperti demam, penurunan berat badan, rasa sakit abdomen, dan diare sedang. Sedangkan pasien dengan *severe* IBD ditandai dengan demam, penurunan berat badan, rasa sakit abdomen, diare parah, anemia, dan *nausea* (Chapman *et al.*, 2008).

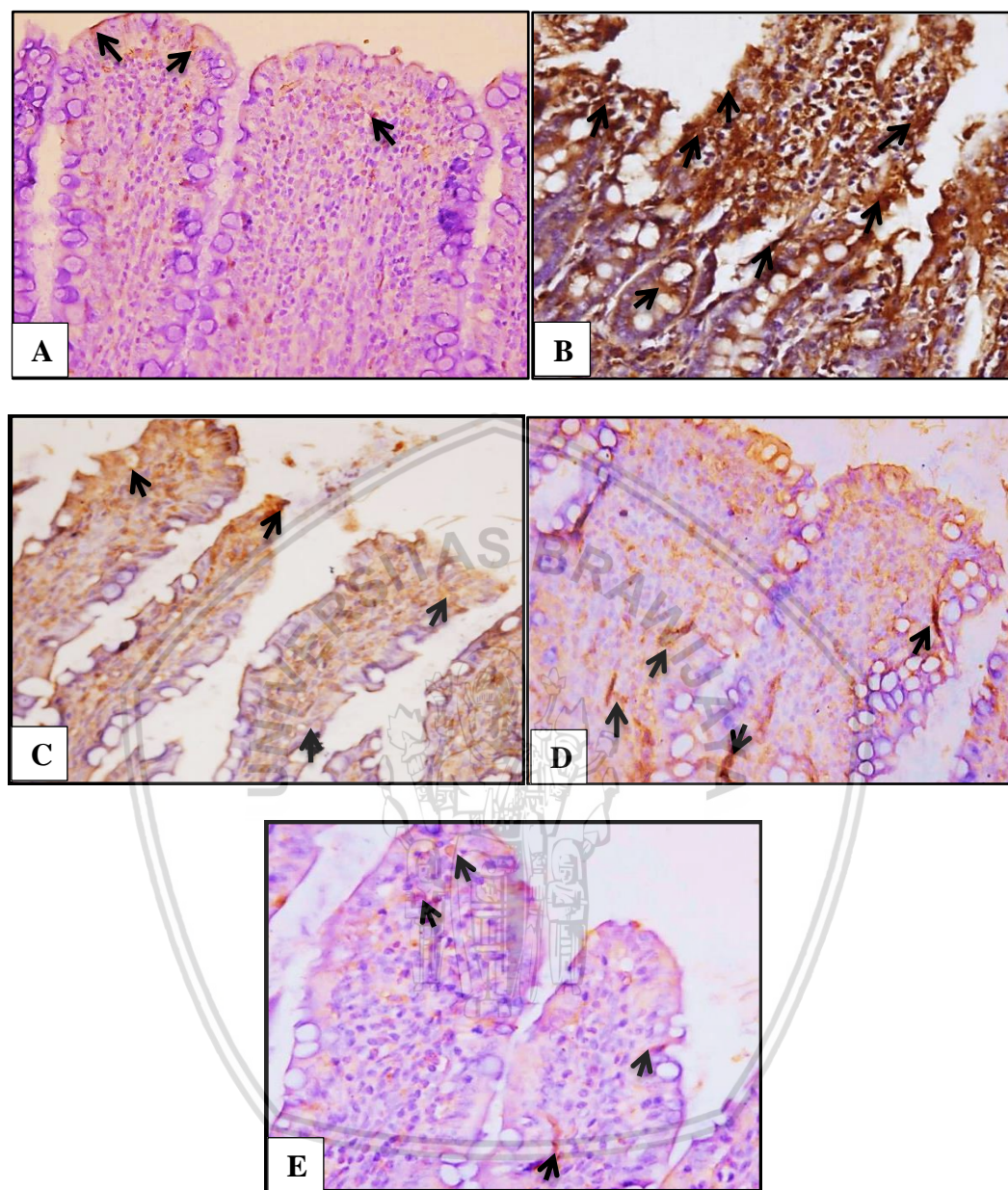
Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi oleh indometasin sebagai model IBD, sebelumnya telah dilakukan aklimatisasi selama 7 hari yang bertujuan untuk membiasakan tikus pada lingkungan dan jenis pakan yang baru. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) selalu diberikan pakan secara rutin sebanyak 40 gr/hari, mengganti *under pad* setiap hari, dan pemberian minum secara *ad libitum*. Gejala klinis yang dapat diamati dalam penelitian ini antara lain ialah penurunan berat badan dan diare. Setelah dilakukan induksi indometasin, tikus diketahui



menunjukkan gejala diare dan mengalami penurunan berat badan. Penurunan berat badan dapat disebabkan oleh penurunan nafsu makan dan gangguan absorpsi makanan. Penimbangan berat badan tikus dilakukan sebelum induksi indometasin hingga terapi hari terakhir untuk mengetahui penurunan berat badan. Setelah diinduksi indometasin, tikus mengalami penurunan berat badan  $\pm 5$  gr. Sejak diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu, tikus putih (*Rattus norvegicus*) mengalami peningkatan berat badan secara membaik (**lampiran 8**).

## **5.2. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$ Ileum Tikus Putih Model IBD.**

Kerusakan organ ileum dapat dilihat dengan mengamati peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada jaringan ileum tikus dengan metode imunohistokimia (IHK). Menurut Huang *et al.* (2014), TNF- $\alpha$  merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag yang berperan sebagai agen proinflamasi. *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) menyebabkan sel inflamasi bermigrasi ke daerah infeksi dan menginduksi pengeluaran metalloproteinase yang dapat menurunkan mekanisme pertahanan intestinal dan penurunan produksi matrix. Menurut Kruidenier *et al.* (2006), produksi metalloproteinase mengalami peningkatan pada intestinal pasien yang mengalami *Inflammatory Bowel Disease* baik *Crohn Disease* dan *Ulcerative Colitis*. Metalloproteinase juga berperan dalam degradasi membran mukosa dengan cara memodulasi sel epitel di intestinal dalam menarik sel leukosit untuk bergerak ke jaringan yang mengalami inflamasi. Intensitas ekspresi TNF- $\alpha$  disebabkan oleh ikatan spesifik antara antigen dan antibodi yang seperti ditunjukkan pada **Gambar 5.1**.



**Gambar 5.1.** Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Ileum Tikus, Perbesaran 400x.

**Keterangan** : (A) Tikus normal (kontrol negatif); (B) Tikus IBD (kontrol positif); (C) Tikus terapi dosis 600 mg/kg; (D) Tikus terapi dosis 700 mg/kg; (E) Tikus terapi dosis 800 mg/kg. (  $\uparrow$  ) Ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum.

Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dalam beberapa macam dosis perlakuan memberikan pengaruh beda nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  ileum tikus model IBD (**Tabel 5.1**). Hasil pengukuran ekspresi TNF- $\alpha$  yang diperoleh, kemudian dianalisa secara kuantitatif menggunakan *Microsoft Excel* dan *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows* dengan dianalisis statistik menggunakan metode *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey  $\alpha = 0,05$ . Perhitungan secara lengkap dapat dilihat pada (**lampiran 10**).

**Tabel 5.1. Rata-Rata Ekspresi TNF- $\alpha$  Ileum Tikus Putih**

Kelompok	Persentase Area TNF- $\alpha$	Ekspresi TNF- $\alpha$ (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok negatif	$0,0916 \pm 0,014^a$	-	-
Kelompok positif	$0,7947 \pm 0,025^c$	88,47 %	0
Perlakuan A	$0,6214 \pm 0,325^d$	85,25 %	21,80 %
Perlakuan B	$0,4279 \pm 0,028^c$	78,59 %	46,16 %
Perlakuan C	$0,2007 \pm 0,118^b$	54,35 %	74,73 %

Keterangan : Notasi a, b, c, d dan e menunjukkan ada perbedaan antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan **Tabel 5.1** diketahui bahwa ekspresi TNF- $\alpha$  ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) kontrol negatif menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan tikus kontrol positif, sedangkan pada kontrol positif IBD memiliki nilai rata-rata berbeda nyata pada tiap perlakuan terapi. Demikian pula dengan kontrol negatif yang memiliki nilai rata-rata yang berbeda nyata dengan perlakuan terapi dosis 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB.

Nilai ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan maupun penurunan yang terjadi karena pengaruh perlakuan. Tikus kontrol negatif memiliki nilai ekspresi TNF- $\alpha$  yang paling sedikit dengan rata-rata sebesar  $0,0916 \pm 0,014$  (**Gambar 5.1.A**). Secara fisiologis tubuh menghasilkan TNF- $\alpha$  dari proses pembentukan radikal bebas (ROS) seperti radikal hidroksil, oksigen singlet, dan radikal superoksida yang berasal dari hasil samping metabolisme sel selama terjadi respirasi sel (Bhattacharya, 2015). *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) memiliki fungsi mekanisme pertahanan tubuh terhadap patogen. Pada tingkat seluler, TNF- $\alpha$  mampu menginduksi terjadinya proliferasi, diferensiasi, pertahanan sel, dan apoptosis dalam kondisi tertentu. Oleh karena itu TNF- $\alpha$  akan tetap terekspresikan dalam keadaan normal (Bradshaw and Dennis, 2009).

Nilai ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus kontrol positif menunjukkan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  menjadi  $0,7947 \pm 0,025$  (**Gambar 5.1.B**). Peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus kontrol positif menunjukkan bahwa induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB mampu untuk meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$ . Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Taiwo and Conteh (2008) bahwa pemberian indometasin sebesar 15 mg/kg BB mampu untuk menimbulkan inflamasi pada saluran pencernaan di tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Kelompok perlakuan digunakan sebagai pembanding tikus model *Inflammatory Bowel Disease* yang diterapi menggunakan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis yang berbeda. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD



dengan masing-masing dosis 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  ileum dibandingkan dengan kontrol positif (**Gambar 5.1.C,D,E**). Nilai ekspresi TNF- $\alpha$  tikus putih yang diberikan terapi secara berturut-turut, yaitu  $0,6214 \pm 0,325$ ;  $0,4279 \pm 0,028$ ; dan  $0,2007 \pm 0,118$  (**Tabel 5.1**). Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dapat berfungsi sebagai agen antiinflamasi yang bekerja dengan cara menghambat aktivasi NF $\kappa$ B. Hambatan dalam aktivasi NF $\kappa$ B akan menyebabkan hambatan dalam mengaktivasi makrofag untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  (Wen *et al.*, 2016).

Analisa statistik menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada tikus kelompok 1 (kontrol negatif) memiliki nilai rata-rata ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar  $0,0916 \pm 0,014$ . Sedangkan pada tikus kelompok 2 (kontrol positif) memiliki nilai presentase peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 88,47% dan presentase area TNF- $\alpha$  sebesar  $0,7947 \pm 0,025$ . Pada kelompok tikus yang diterapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu kelompok 3 (terapi dosis 600 mg/kg BB) berbeda nyata dengan tikus kontrol 2 (kontrol positif) dan mengalami penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  menjadi  $0,6214 \pm 0,325$  dan presentase penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 21,8%. Hasil tersebut menunjukkan terjadi pengaruh terhadap penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  dengan pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 600 mg/kg BB, namun tidak terlalu signifikan. Sedangkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus putih kelompok 4 (terapi dosis 700 mg/kg BB) diketahui berbeda nyata dengan kelompok 2 (kontrol positif) dan mengalami penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  menjadi  $0,4279 \pm 0,028$  dan presentase penurunan

ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 46,16%. Penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada kelompok 4 menunjukkan pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 700 mg/kg BB mampu untuk menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  lebih baik dibandingkan dengan dosis 600 mg/kg BB. Kelompok 5 (terapi dosis 800 mg/kg BB) menunjukkan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  yang signifikan yaitu menurun menjadi  $0,2007 \pm 0,118$  yang berbeda nyata dengan tikus kelompok 2 (kontrol positif) dan presentase penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  sebesar 74,73%. Terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 800 mg/kg BB mampu untuk menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) paling efektif dibandingkan dengan dosis yang lain.

Tikus putih yang diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu diketahui mengalami penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  dikarenakan daun ubi jalar ungu mengandung senyawa aktif seperti flavonoid, polifenol, dan antosianin yang berperan dalam antiinflamasi dan antioksidan yang mampu membantu mengikat radikal bebas dengan cara menurunkan anion peroksida dan hidrogen peroksida yang timbul karena pemberian indometasin dosis tinggi (Phelan *et al.*, 2009).

Perbedaan ekspresi TNF- $\alpha$  menunjukkan bahwa kandungan daun ubi jalar ungu dapat berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan dengan mengurangi radikal bebas dalam tubuh. Daun ubi jalar ungu mengandung flavonoid yang dapat mengikat radikal bebas dan menekan kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas seperti OH $^{\cdot}$  (Chobot *et al.*, 2016).

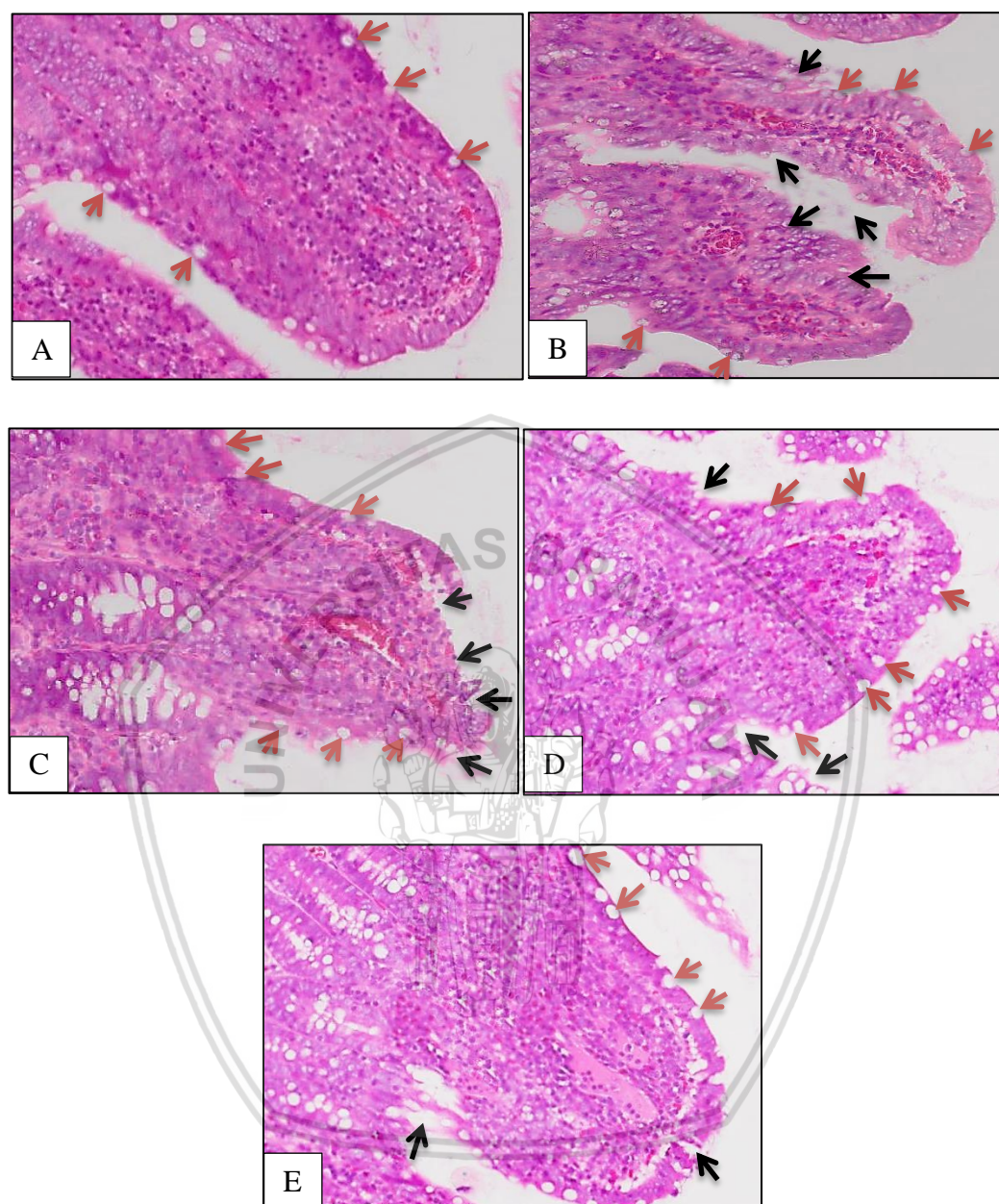
Polifenol, flavonoid, dan antosianin berkerja dengan mengikat radikal bebas seperti superoksida (O $_2^{\cdot-}$ ), singlet oksigen ( $^{\cdot}$ O $_2$ ), peroksida (ROO $^{\cdot}$ ), hidrogen



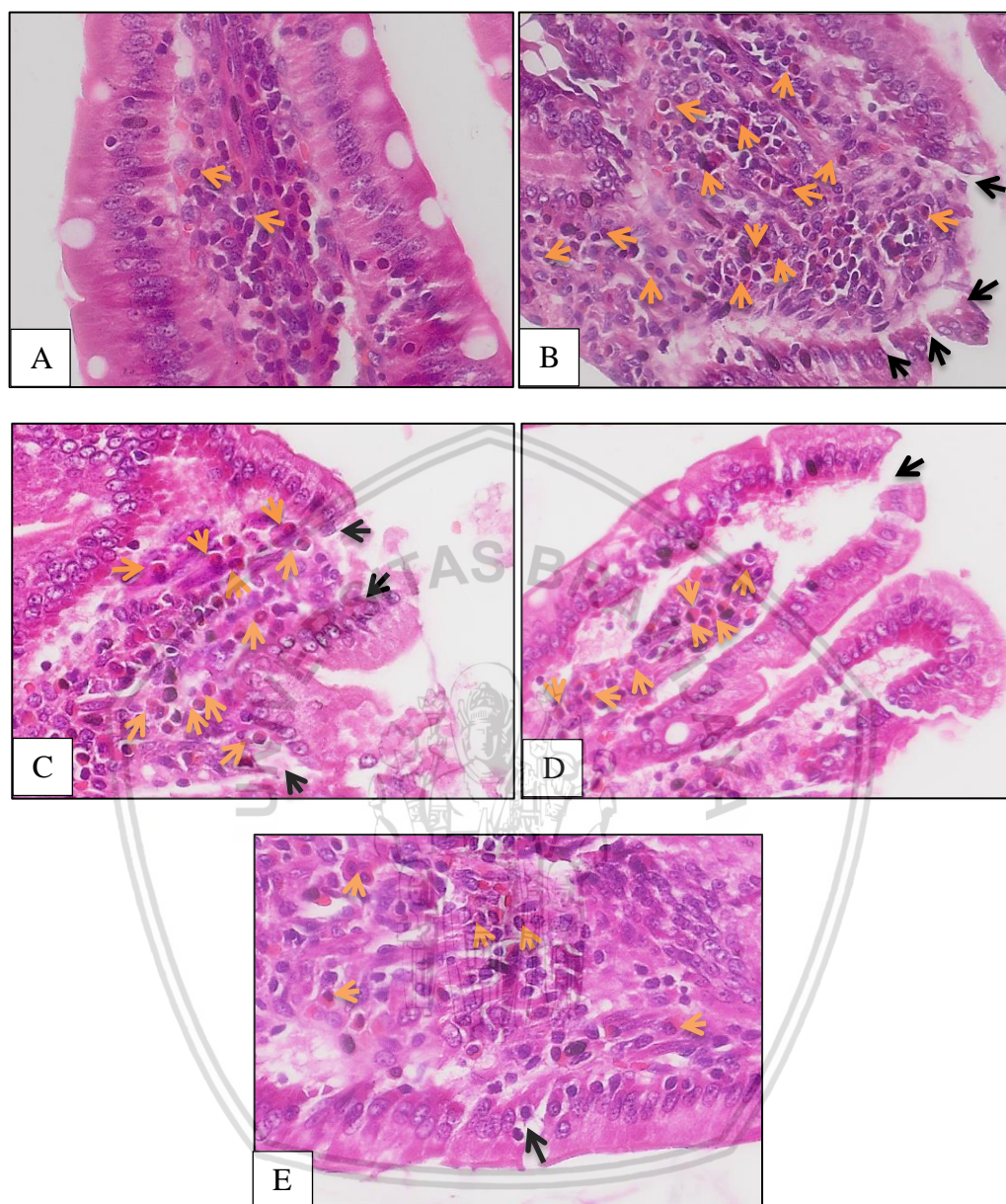
peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dan hidroksil radikal ( $\text{OH}$ ). Antioksidan berperan sebagai ROS *scavenging* yaitu dengan memberikan donor ion hidrogen ( $\text{H}^+$ ) pada senyawa radikal bebas sehingga menjadi lebih stabil, meningkatkan kapasitas penyerapan oksigen radikal sel, serta mengurangi peroksidasi lipid (Bhattacharya *et al.*, 2014). Penurunan radikal bebas pada jaringan dapat menyebabkan penurunan sitokin proinflamasi sehingga mengurangi inflamasi. Selain itu, antosianin juga berperan dalam melakukan penghambatan aktivasi NF $\kappa$ B. Penghambatan aktivasi NF $\kappa$ B dapat menyebabkan penghambatan dalam terbentuknya IKK (IkB kinase) yang berperan dalam mendegradasi IkB. Inhibitor NF $\kappa$ B (IkB) berperan dalam mengikat NF $\kappa$ B sehingga NF $\kappa$ B tetap dalam kondisi inaktif. Terhambatnya aktivasi dari NF $\kappa$ B akan menyebabkan hambatan dalam pembentukan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  sehingga mampu untuk menurunkan inflamasi pada ileum (Miguel, 2011).

### **5.3. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu Terhadap Gambaran Histopatologi Ileum Tikus Putih Model IBD.**

Histopatologi jaringan merupakan salah satu parameter untuk mengukur suatu tingkat keberhasilan dari terapi. Ileum normal tersusun atas vili, susunan sel epitel yang tersusun rapi, lapisan mukosa, lapisan submukosa, lapisan muscular, dan lapisan serosa (Inamoto, *et al.*, 2008). Indikator tersebut dapat dijadikan acuan untuk mengetahui histopatologi ileum tikus putih model *Inflammatory Bowel Disease*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) dapat memperbaiki gambaran histopatologi ileum yang ditunjukkan pada **Gambar 5.2** dan **Gambar 5.3**.



**Gambar 5.2.** Histopatologi ileum tikus dengan Pewarnaan HE, Perbesaran 400x  
**Keterangan** : (A) Kontrol negatif, (B) Kontrol positif, (C) Dosis terapi 600 mg/kg, (D) Dosis terapi 700 mg/kg, (E) Dosis terapi 800 mg/kg.  
 (↑) diskontinuitas sel epitel, (↑) sel goblet.



**Gambar 5.3.** Histopatologi ileum tikus dengan Pewarnaan HE, Perbesaran 1000x  
**Keterangan** : (A) Kontrol negatif, (B) Kontrol positif, (C) Dosis terapi 600 mg/kg, (D) Dosis terapi 700 mg/kg, (E) Dosis terapi 800 mg/kg.  
 (↗) diskontinuitas sel epitel, (↗) infiltrasi sel radang.



Gambaran histopatologi ileum dengan pewarnaan HE pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok 1 (kontrol negatif) (**Gambar 5.1.A**) memiliki bentuk vili yang teratur, lapisan epitel kolumnar yang tersusun rapi, dan sel goblet dalam jumlah yang cukup banyak. Sel goblet terletak diantara susunan sel epitel yang tersusun rapi dan berbentuk menyerupai piala. Pada kelompok 1 menunjukkan kontinuitas sel ileum yang baik berbeda dengan kelompok 2 (kontrol positif) (**Gambar 5.1 B**), yaitu jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD terjadi kerusakan, yaitu diskontinuitas sel epitel, vili terlihat patah, serta terlihat infiltrasi sel radang pada ileum. Kerusakan epitel ileum pada kelompok 2 (kontrol positif) menunjukkan erosi epitel, yaitu pada sebagian sel epitel hilang karena rusak sehingga lapisan epitel tidak lagi tertata secara lengkap dan rapi, yang disebut sebagai diskontinuitas epitel dan terdapat banyak infiltrasi sel radang. Sel goblet pada kontrol positif mengalami penurunan jumlah dan sel goblet tidak nampak diantara susunan sel epitel yang mengalami diskontinuitas. Menurut Magroa *et al.* (2013), pemberian indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB dapat menyebabkan inflamasi ileum yang menyebabkan perubahan histopatologi. Perubahan histopatologi yang dapat diamati ialah bentuk vili yang irregular, erosi vili superfisial, dan infiltrasi sel radang pada bagian lamina propria. Infiltrasi sel radang terdiri atas limfosit, monosit, basofil, eosinofil, dan neutrofil.

Gambaran histopatologi ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD kelompok 3 (dosis terapi 600 mg/kg BB) (**Gambar 5.1 C**), terlihat bahwa jumlah sel goblet mengalami penurunan, terdapat perbaikan sel epitel ileum yang ditandai dengan kontinuitas sel, namun diketahui masih banyak terdapat diskontinuitas

pada beberapa bagian sel epitel ileum dan infiltrasi sel radang, namun dibandingkan dengan kontrol positif masih mengalami sedikit penurunan.

Gambaran histopatologi ileum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model IBD kelompok 4 (terapi 700 mg/Kg BB) (**Gambar 5.1 D**), menunjukkan peningkatan jumlah dari sel goblet serta terjadi perubahan yang ditandai dengan kontinuitas sel epitel ileum serta penurunan infiltrasi sel radang dibandingkan dengan tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok 2 (kontrol positif), dan juga lebih baik dibandingkan dengan kelompok 3 (terapi 600 mg/Kg BB).

Gambaran kelompok 5 (Terapi dosis 800 mg/Kg BB) (**Gambar 5.2 E**), menunjukkan perbaikan sel epitel dan infiltrasi sel radang yang lebih baik selain itu sel goblet yang terletak diantara barisan sel epitel terlihat mengalami penambahan jumlah dibandingkan dengan kelompok 2 (kontrol positif), kelompok 3 (Terapi dosis 600 mg/Kg BB) dan kelompok 4 (Terapi dosis 700 mg/Kg BB).

Sel goblet terletak diantara sel epitel dan merupakan sumber utama produksi mukus in intestinal. Lapisan intestinal yang paling dekat dengan lumen dilindungi oleh lapisan mukus yang berfungsi sebagai perlindungan mukosa dari infeksi patogen dan berperan dalam transfer nutrisi (Kim and Khan, 2013). Pada ileum tikus kontrol negatif, sel goblet ditemukan diantara sel epitel dalam jumlah yang cukup banyak sehingga produksi mukus yang berperan dalam pertahanan intestinal masih diproduksi dalam jumlah yang cukup untuk melindungi ileum dari infeksi mikroba. Sedangkan pada ileum tikus kontrol positif, diketahui sel goblet ditemukan dalam jumlah yang sedikit sehingga menyebabkan produksi mukus berkurang. Menurut Yang *et al*, (2013), induksi indometasin dapat

menghambat produksi PGE<sub>2</sub>, apabila produksi PGE<sub>2</sub> mengalami penurunan maka dapat menyebabkan gangguan transport HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sehingga menghalangi proses maturasi mukus, eksositosis dan sekresi mukus. Produksi mukus yang menurun inilah yang menyebabkan penurunan pertahanan ileum. Pada ileum tikus yang diberikan dosis terapi 600 mg/kg BB diketahui masih menunjukkan jumlah sel goblet dalam jumlah yang sedikit sehingga pertahanan ileum masih rendah sehingga mikroba lumen mudah memasuki sel, selain itu ileum masih mengalami inflamasi yang ditunjukkan dengan infiltrasi sel radang yang cukup banyak. Pada ileum tikus yang diberikan dosis terapi 700 mg/kg BB sudah mulai menunjukkan jumlah sel goblet yang lebih baik, namun tidak sebaik pada ileum tikus yang diberikan dosis terapi sebanyak 800 mg/kg BB.

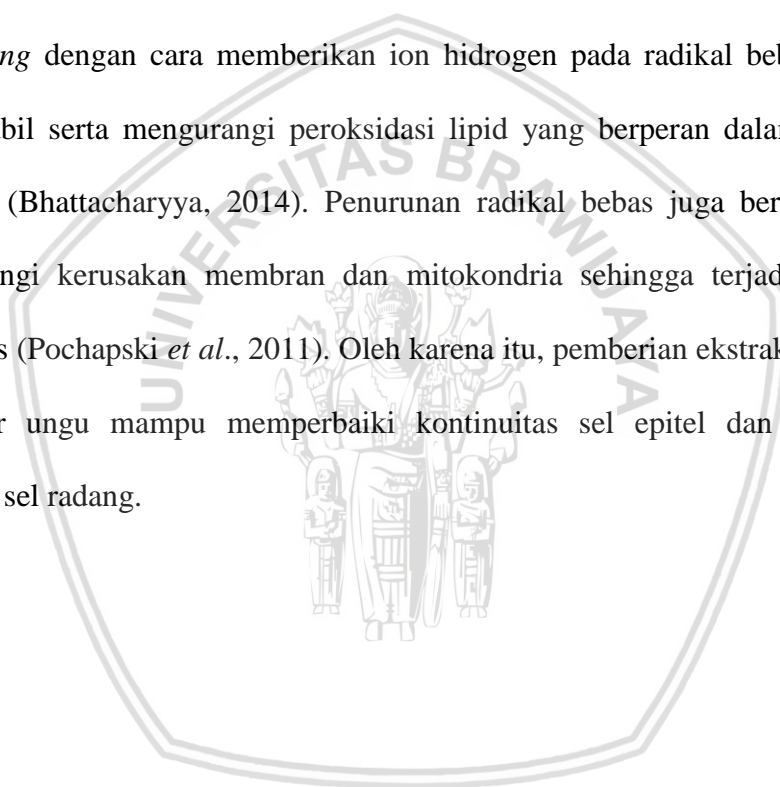
Perubahan gambaran histopatologi ileum disebabkan oleh efek pemberian indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB secara per oral pada tikus. Menurut Hatazawa *et al.* (2006), indometasin dapat menghambat COX-1 dan COX-2 sehingga terjadi penurunan perlindungan mukosa ileum, oleh karena itu mikroorganisme intestinal mudah dalam memasuki jaringan ileum dan terjadi manifestasi berupa inflamasi. Menurut Stankov (2012), inflamasi merupakan respon fisiologis tubuh terhadap adanya infeksi, iritasi, maupun luka. Inflamasi biasa ditandai dengan kemerahan, pembengkakan, panas, dan rasa sakit pada daerah yang mengalami inflamasi. Menurut Selders *et al.* (2017), kondisi inflamasi akan menimbulkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan menyebabkan leukosit masuk kedalam jaringan. Pelepasan leukosit bertujuan untuk melepaskan sel radang yang akan memfagositosis. Pelepasan sel radang ke



jaringan melibatkan sel inflamasi seperti eosinofil, basofil, neutrofil, limfosit, dan monosit namun sel radang yang mendominasi adalah neutrofil. Hal tersebut dikarenakan pada awal proses infeksi, sel yang pertama kali tertarik ke daerah inflamasi yaitu neutrofil.

Migrasi sel radang disebabkan oleh pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ . Pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$  dapat mengakibatkan vasokonstriksi pembuluh darah, meningkatkan permeabilitas vaskuler pada membran sel melalui jalur klasik, jalur lectin, dan jalur alternatif. Peningkatan permeabilitas vaskuler terjadi karena anafilatoksin. Aktivasi komplemen C3 dan C5 akan menghasilkan fragmen kecil seperti C3a dan C5a yang merupakan anafilatoksin yang berpengaruh terhadap degranulasi sel mast dalam pelepasan histamin. Histamin yang dilepaskan oleh sel mast akibat pengaruh komplemen dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler sehingga dapat memberikan jalan untuk migrasi sel radang ke tempat terjadinya inflamasi. Aktivasi komplemen C3a dan C5a merupakan anafilatoksin yang berperan dalam kemoatraktan neutrofil. Setelah terjadi perubahan permeabilitas vaskuler, neutrofil menempel pada sel endotel dan bermigrasi keluar pembuluh darah ke dalam jaringan yang mengalami inflamasi. Makrofag juga berperan dalam pelepasan TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  akan meningkatkan ekspresi selektin-E yang kemudian menginduksi peningkatan ekspresi *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). Neutrofil, monosit, dan limfosit mengenali molekul adhesi tersebut dan bergerak ke dinding pembuluh darah selanjutnya untuk bergerak menuju ke jaringan (Abbas *et al.*, 2010)

Regenerasi mukosa ileum terjadi karena aktivitas polifenol, flavonoid, dan antosianin yang berperan sebagai antioksidan. Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu mengandung senyawa polifenol, flavonoid, dan antosianin. Senyawa aktif dalam daun ubi jalar ungu inilah yang bekerja dengan menghambat reaksi oksidasi dalam tubuh sehingga mampu menurunkan radikal bebas dalam jaringan (Hue *et al.*, 2012). Mekanisme antioksidan diantaranya ialah berperan sebagai ROS *scavenging* dengan cara memberikan ion hidrogen pada radikal bebas sehingga lebih stabil serta mengurangi peroksidasi lipid yang berperan dalam kerusakan jaringan (Bhattacharyya, 2014). Penurunan radikal bebas juga berperan dalam mengurangi kerusakan membran dan mitokondria sehingga terjadi penurunan apoptosis (Pochapski *et al.*, 2011). Oleh karena itu, pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu mampu memperbaiki kontinuitas sel epitel dan mengurangi infiltrasi sel radang.



## BAB 6. PENUTUP

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) berpengaruh dalam penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  ileum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin, dengan dosis paling efektif sebesar 800 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*) berpengaruh dalam memperbaiki gambaran histopatologi ileum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin, dengan dosis paling efektif sebesar 800 mg/kg BB.

### 6.2. Saran

Berdasarkan data hasil penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek indometasin terhadap parameter lain seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Nuclear Factor Kappa B* (NF $\kappa$ B), dan *Malondialdehyde* (MDA) pada tikus putih model *Inflammatory Bowel Disease*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H and Pillai S. 2010. *Celullar and Molecular Immunology*, 6th Ed. Philadelphia: W.B Saunders Company.
- Aulanni'am, Roosdiana R dan Rahmah. 2011. Potensi Fraksi Etanol dan Etil Asetat Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) Terhadap Penurunan Kadar Malondialdehid dan Perbaikan Gambaran Histologis Jejunum Usus Halus Tikus IBD. *Jurnal Jurusan Kimia Fakultas MIPA*. Universitas Brawijaya.
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2013. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals 2013 Edition*. Schaumburg.
- Anita, B.S., Akpan, E.J., Okon, P.A and Umoren, I.U. 2006. Nutritive and Anti-Nutritive Evaluation of Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*) Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*. 5(2) : 166-168.
- Bachman, Gary. 2012. Sweet potato vine adds unique colors. <http://extension.msstate.edu/news/southern-gardening/2012/sweet-potato-vine-adds-unique-colors>. [14 Februari 2018].
- Baki, M., Akaman, P., Vural, S., Dogru-Abbasogh, S. Ozderya, A., Karadag, and Usyal, M. 2012. The Combination of Interleukin-10 – 1082 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  or Interleukin-6 Genes Polymorphism Suggest An Association with Succptibility to Hashimoto Thrioiditism. *International Journal of Immunopharmacology*. 12: 543-546.
- Balmus, I.M., Ciobica,A., Trifan,A and Stanciu, C. 2016. The Implication of Oxidative Stress and Antioxidant Therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspect and Animal Models. *The Saudi Journal of Gastroeneterology*. 22(1): 3-17.
- Bamias, G; Nyce M, ; Sarah A. and Cominelli, F. 2005. *New Concepts in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease*. Washington DC: American Collage Physician.
- Bhattacharya, S., Asima, Rannajoy,C., Mitra, S., Crowe, S.E. 2014. Oxidative Stress: An Essential Factor in The Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Disease. *Physol Rev*. Vol.9 (4): 329 – 354.
- Bhattacharya, S. 2015. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. *Free Radicals in Human Health and Disease*. 978-2035.

- Bradshaw, R.A and Dennis, E.A. 2009. *Handbook of Cell Signaling Volume 1*. Oxford: Academic Press.
- Bures, J.J. Pejchal, K. Kvetina, A. Tichy, S. Rejhrt, M. Kunes and Kopavoca, M. 2011. Morphometric Analysis of the Porcine Gastrointestinal Tract in a 10-Day High Dose Indomethacin Administration with or without Probiotic Bacteria *Eschericia Coli*. *Journal of Human Experimental Toxicology*. 0(12)195-196.
- Campbell, K.J. 2006. *Regulation of NF- $\kappa$ B Function*. Biochem Soc Sym. 165-180.
- Cerquetella M, Spaterna A, Laus F, Tesei B, Rossi G and Antonelli, E. 2010. Inflammatory bowel disease in the dog: Differences and similarities with humans. *World J Gastroenterol* 16(9): 1050-1056 1007-9327.
- Chapman, M.M., Pharm, D., Joseph, D., Whalen, K. 2008. Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Abbreviation Med*. 12:4, 39-47.
- Chiao, M.C., Ya, L.L., Oliver, C., Ching, Y.H., Ming, J.S dam Jen, F.L. 2008. Consumption of purple sweet potato leaves decreases lipid peroxidation and DNA damage in humans. *Asia Pac J Clin Nut*. 17 (3):408-414 408.
- Chobot, V., Hadacek, F., Bachmann, G., Weckwerth, W., Kubicova, L. 2016. Pro- and Antioxidant Activity of Three Selected Flavan Type Flavonoids: Catechin, Eriodictyol and Taxifolin. *International Journal of Molecular Science*. 17121986.
- Dunlop, R.H and Malbert, C.H. 2004. *Pathophysiology of the Gastrointestinal Tract Veterinary Pathophysiology*. Iowa: Blackwell Publishing. 111-142
- Eleazu, C.O and Ironua, C. 2013. Physicochemical Composition and Antioxidant Properties of a Sweet Potatoes Variety (*Ipomoea batatas*) Comercially Sold in South Eastern Nigeria. *African Journal Biotechnology*. 720-727.
- Eroschenko, V.P and Fiore, M.S.H. 2013. *DiFiore's Atlas Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Fidrianny, I., Windyaswari, A.S, and Wirasutisna, K.R. 2013. Antioxidant Capacities of Various Leaves Extract from Five Colors Varietes of Sweet Potatoes Tubers Using ABTS, DPPH Assays and Correlation with Total Flavonoid, Phenolic, Carotenoid Compound. *Research Journal Medical Plant*. Bandung Institute Technology.
- Firmansyah, A.M. 2013. Perkembangan Terkini Diagnosis dan Penatalaksanaan Inflammatory Bowel Disease. *Cermin Dunia Kedokteran*. 203 Vol. 40



- Frolkis, A., Dieleman, L.A., Barkema, H.W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R.N., Madsen, K. and Kaplan, G.C. 2012. Environment and The Inflammation Bowel Disease. *Pulsus Group*.
- Gersemann, M., Wehkamp, J. and Stange, E.F. 2012. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*. 421 – 428.
- Giugliano, D., Ceriello, A., and Esposito. 2006. The Effect of Diet on Inflammation. *Journal of the American College of Cardiology*. 677 – 685.
- Ginting, E., Utomo, J.S., Yulifianti, R. Jusuf, M. 2011. *Potensi Ubi Jalar Ungu Sebagai Pangan Fungsional*. Penelitian Balai Penelitian Tanaman Kacang dan Umbi (Balitkabi) Malang.
- Harirforoosh, S., Asghar, W. and Jamali, F. 2013. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. *Article in Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. DOI: 10.18433/J3VW2F.
- Hatazawa, Ryo, Ryoko Ohno, Mayu Tanigami, Akiko Tanaka, dan Koji Takeuchi. 2006. Roles of Endogenous Prostaglandins and Cyclooxygenase Isozymes in Healing of Indomethacin-Induced Small Intestinal Lesions in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 318 (2): 691-699.
- Hofstetter, J., Suckow, M.A. and Hickman, D.L. 2005. *Chapter 4: Morphophysiology*. In: *The Laboratory Rat*, pp 8. 93 – 125. Elsevier.
- Huang, L.C., Fei, W., Hao, S.Z., Ping, Y.M., Lu. C. 2014. Expression and distribution of TNF- $\alpha$  and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 412-416.
- Hubrecht, R. and Kirkwood, J. 2010. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals 8th Edition*. Wiley-Blackwell. UK. Pp. 312-313.
- Hue, Seow, M., Boyee, A.M and Somasundram, C. 2012. Antioxidant Activity, Phenolic and Flavonoid Contents in The Leaves of Different Varieties of Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*). *AJCS*. 6(3): 375 – 380.
- Hussain, T., Bie, T., Yulong, Y., Blachier, F., Myrlene, C.B and Rahu, N. 2016. Review Article Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Inamoto, T., Namba, M. Qi, W.M., Yamamoto, K. Yokoo, Y., Miyata, H., Kawano, J. Yokoyama, T. Hoshi, N and Kitagawa, H. 2008. An



immunohistochemical detection of actin and myosin in the indigenous bacteria-adhering sites of microvillous columnar epithelial cells in Peyer's patches and intestinal villi in the rat jejunioileum. *J Vet Med Sci.* 70(11): 1153-8.

- Kathrani, A., Holder, A. Catchpole, B., Alvarez, L., Simpson, K., Werling, A., and Allenspach, K. 2011. Risk-Associated Haplotype for Canine Inflammatory Bowel Disease Confers Hyper-Responsiveness to Flagellin. *Journal of Biological Sciences Research Council and Pfizer.* University of London, St George's.
- Kazuhide, H.E. Umegaki, T. Wattanabe, Y. Yoda, E. Morita, M. Murabo, S. Tokioka and Arakawa, T. 2009. Present Status and Strategy of NSAIDs-Induced Small Bowel Disease. *Journal J-Gastroenterol.* Pp 44:879-888.
- Kim, J.J and Khan, W.I. 2013. Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections. *MDPI Pathology Journal.* 55-70.
- Klein, A and Eliakim, R. 2010. *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease.* Israel: Department of Gastroenterology, Rambam Health Care Haifa.
- Kruidenier, L., Mac, D.T., Collin, J.E., Pender, S.L.F., Sanderson. 2006. Myofibroblast Matrix Metalloproteinases Activate the Neutrophil Chemoattractant CXCL7 From Intestinal Epithelial Cells. *Plum X Metrics AGA Journal.* 127–136.
- Kusriningrum. 2010. *Dasar Perancangan Percobaan dan rancangan Acak Lengkap.* Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga Surabaya.
- Langner, C. Magro, F. Driessen, A. Ensari A, Gerasimons, Mantzaris, J. Villancci, V and Bechaunu, G. 2013. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *The European Journal of Pathology.* 0945-6317
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudry, M.T., Wang, S., Liu, H. Yin, Y. 2016. Quercetin, Inflammation and Immunity. *National Journal Library of Medicine. National Institute Health.* 168-169.
- Magroa, F., Langner, C., Driessenc, A., Ensari, A., Geboes, K., Mantzaris, G.J., Villanacci, V., Becheanuh, G., Nunes, P.B., Cathomas, G., Frisk, K.A., Mescoli, C. 2013. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis.* 827–851.

- Miguel, M.G. 2011. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 07-15.
- Mwanri, A.W., Makau, K and Laswai, H.S. 2011. Nutrients and antinutrients composition of raw, cooked and sun dried sweet potatoes leaves. *African Journal of Food and Agriculture*. 2 (4) 161- 168.
- Phelan M, A. Ahere, J. Richard, F. Gerald, M. Nora, O'Brien. 2009. Casein Deriver Bioactive Peptides : Biological Effect, Industrial Uses, Safety Aspects and Regulatory Status. *International Dairy Journal*. 19 : 643–654
- Pochapski MT, Fosquiera EC, Esmerino LA, dos Santos EB, Farago PV, Santos FA, Groppo FC. 2011. Phytochemical screening, antioxidant, and antimicrobial activities of the crude leaves extract from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Pharmacognosy Magazine*. Vol 26:165-190.
- Podolsky, D. K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *Journal N. England J Med*. 347 (6) : 417 – 429.
- Popa, C., Netea, M., Piet, L.C.M., Jos, W.M and Stalenhoef, A. 2007. The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *The Journal of Lipid Research*. 48, 751-762.
- Rachmi, M., Yudi P dan Erna S. 2010. *Efek Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (Ipomoea batatas (L.) Lamk) terhadap Kadar AST-ALT dan Histopatologi Hepar Pada Mencit yang Diberi Perlakuan Aktivitas Fisik Maksimal*. Program Pendidikan Dokter Universitas Islam Malang.
- Ramos, V.J.A. 2005. Technical Aspect of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 42 (4): 405 – 426.
- Riansyah, Y. Mulqie, L dan Choesrina, R. 2015. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* (L.) Lamk) terhadap Tikus Wistar Jantan. *Jurnal Prodi Farmasi Fakultas MIPA Unisba*. 201 - 216.
- Samuelson, D.A. 2007. *Textbook of Veterinary Histology*. USA: Saunders Elsevier.
- Scopin, A.E., Saveljevu, A.P., Suntsiva, N.A., Gnophyanxaya, S., Tikhonova, A.N. Abramov, A.V. 2011. Digestive System of The Laotian Rat *Laonastes Aenigmamus* (Rodentia: Diatomydae) From The Evolutionary Viewpoint. *Proceedings of the Zoological Institute RAS*. Vol. 315, No. 1, 2011, pp. 3–18.

- Selders, G.S., Fetz, A.E., Radic, M.Z., Bowlin, G.L. 2017. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*. 55–68
- Sholichah, N.A., Aulanni'am, Mahdi, C. 2012. Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (*Lannea coromandelica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Laboratorium Biokimia*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Stankov, S. 2012. Definition of Inflammation, Causes of Inflammation and Possible Anti-inflammatory Strategies. *The Open Inflammation Journal*.
- Suckow, M., Weisbroth, S and Franklin, C. 2006. *The Laboratory Rat 2nd Edition*. USA: Academic Press.
- Sugata, M., Lin, C.Y and Yang CS. 2015. *Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of Taiwanese Purple-Fleshed Sweet Potatoes (Ipomoea batatas L. Lam) Extracts*. Department of Biotechnology, Asia University Taiwan.
- Sulastris, Erlidawati, Syahril, Nazar M dan Andayani, T. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*) Hasil Budidaya Daerah Saree Aceh Besar. *Prodi Pendidikan Kimia, FKIP Unsyiah, Universitas Syiah Kuala*. 1412-5064
- Sun, J., Shen, X., Li, Y., Guo, Z., Zhu, W., Zuo, L., Zhao, J., Gu, L., Gong, J., Li, J. 2016. Therapeutic Potential to Modify the Mucus Barrier in Inflammatory Bowel Disease. *US National Library of Medicine National Institute of Health*. 8(1):44.
- Supriyono, Teguh. 2008. Kandungan Beta Karoten, Polifenol Total dan Aktivitas Merantas Radikal Bebas Kefir Susu Kacang Hijau oleh Pengaruh Jumlah Starter (*Lactobacillus bulgaricus* dan *Candida kefir*) dan Konsentrasi Glukosa. *Journal Universitas Diponegoro*.
- Taiwo, V. O. and Conteh, O. L. 2008. The rodenticidal effect of indomethacin: pathogenesis and pathology. *Journal of Veterinarkif Askiv*. Department of Veterinary Pathology, University of Ibadan, Ibadan. 167-178.
- Takeuchi, K., Tanaka, A., Ohno, R and Yokota, A. 2003. *Role of Cox Inhibition in Pathogenesis of NSAIDs Induced Small Intestine damage*. Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina, Kyoto: Japan. 165-182.

- Truong, V.D., Deighton, N., Thompson, R.T., Mc. Feeter, F.F., Dean, L.O., Pecota, K.V and Yencho, G.C. 2010. *Characterization of Anthocyanin and Antochianydin in Purple Fleshed Sweetpotatoes*. HP-CD-DAD/ES.MS/MS. In *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 58, 404-410.
- Udobang, J.A., Bassey, A.I.L and Okokon, J.E. 2017. Antiulcer activities of the ethanol root extract of *Setaria megophylla (Steud)* T.Dur and Schinz in rat
- Wen, Q., Fu, Z., Tu, Z., Zhang, L., Wang, H and Huang, T. 2016. Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*. Vo. 15, p. 11-18.
- Yang, N., Abigail, M., Garcia, S and Quinton, M. 2013. Normal mucus formation requires cAMP-dependent  $\text{HCO}_3^-$  secretion and  $\text{Ca}_2^+$  mediated mucin exocytosis. *The Journal of Physiology*. Pp 4581–4593 4581
- Yoshimoto, O. 2007. Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas* L., *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 279–286.

